

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE TIEMI YAMAGUSHI

**PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE FEIJÃO
DESIDRATADO COM BAIXO TEOR DE OLIGOSSACARÍDEOS
DA FAMÍLIA RAFINOSE**

CURITIBA

2008

CAROLINE TIEMI YAMAGUISHI

**PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE FEIJÃO
DESIDRATADO COM BAIXO TEOR DE OLIGOSSACARÍDEOS
DA FAMÍLIA RAFINOSE**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. José Luis Parada

CURITIBA

2008

*Dedico à **Grace L. U. M. Yamaguishi**
(in memorian) por ser modelo de
força e perseverança.*

TERMO DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre esteve ao meu lado e permitiu que eu alcançasse mais essa conquista.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol por toda a orientação, incentivo, compreensão e confiança durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Luis Parada pelas várias contribuições científicas e por todo apoio e incentivo.

À Prof. Dra. Adenise L. Woiciechowski e à Mitiyo pela disposição e ajuda na análise dos resultados.

À Prof. Dra. Luciana P. S. Vandenberghe, ao Prof. Dr. Júlio C. Carvalho à Doutoranda Michele Spier por toda a ajuda e apoio.

Aos professores da banca examinadora Dra. Elza I. Ida e Dr. Massami Shimokomaki por terem participado da avaliação deste trabalho, pelo tempo dedicado às correções e pelas importantes contribuições e sugestões.

À Prof. Sônia Stertz por ter permitido a execução das análises físico-químicas no Laboratório de Química Analítica e por toda a sua colaboração e ajuda. Agradeço também a Everly pelo seu auxílio.

À Dra. Flávera Camargo Prado por sua colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, à FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA e à CAPES/REUNI pelo suporte financeiro.

Ao aluno de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia Luís Felipe Minozzo Figueiredo pela sua ajuda e dedicação.

À mestranda Cássia Sanada e a aluna Patrícia Milla Gouvêa pela imensa ajuda na execução das análises de atividade enzimática.

Ao meu amigo e mestre Augustus Portella por toda a contribuição na parte estatística deste trabalho.

Ao meu amigo e mestre Luiz Alberto Junior Letti pelo auxílio na parte prática e à Susan Karp pela disposição e ajuda ao longo deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório (Sascha, Lucianna, Andréa, Carol M., Carol C., Marisa, Jefferson, Rafael, Gessiel, Daniel Ernesto entre outros) por toda a colaboração e convívio nestes anos de pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Luiz Ferreira da Trindade por ter me incentivado a ingressar no mestrado e por todo o apoio.

Ao meu namorado Renan pelas idas ao laboratório aos fins de semana e à noite e por todo o seu incentivo, paciência e compreensão.

Agradeço à Leônidas Eduardo Barbosa (in memoriam) por sempre ter me incentivado a lutar para alcançar os meus objetivos.

À minha família que sempre me apoiou e me incentivou a nunca desistir, mesmo nos momentos difíceis, o meu Muito Obrigada!

RESUMO

O feijão faz parte dos alimentos tradicionais consumidos na dieta da população brasileira e de muitos outros países, constituindo-se da principal fonte de proteína dos brasileiros, seguido pela carne bovina e pelo arroz. Ele é considerado um excelente alimento porque fornece nutrientes essenciais, como proteínas, ferro, cálcio, zinco, magnésio, vitaminas (principalmente do complexo B), carboidratos e fibras. No entanto, a presença de substâncias, como os oligossacarídeos da Família Rafinose, prejudicam a digestibilidade do feijão, causando o fenômeno da flatulência, que é geralmente atribuída a ausência da enzima α -galactosidase em humanos e animais. Este trabalho teve como objetivo a aplicação de um processo biotecnológico na produção de um caldo de feijão, com teores reduzidos em estaquiose e rafinose, responsáveis pela flatulência. O microrganismo usado no processo fermentativo foi o *Lactobacillus agilis* LPB 56, que mostrou capacidade de sobrevivência no caldo de feijão previamente padronizado. O planejamento estatístico mostrou que as variáveis mais significativas foram a temperatura de incubação e o uso de carbonato de cálcio (CaCO_3). Fermentações em biorreator foram realizadas, utilizando os pontos ótimos, estabelecidos a 37°C e 1,0% de CaCO_3 . A taxa de inóculo usada foi de 10% (v/v) e uma agitação de 160 rpm foi necessária para a homogeneização do CaCO_3 . Os resultados demonstraram um consumo máximo de 99,3% da estaquiose e 100% da rafinose presente feijão cru após 18 horas de fermentação. O incremento de células viáveis neste período foi de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL para $7,0 \times 10^8$ UFC/mL. A maior atividade da enzima α -galactosidase foi 0,162 U/mL às 6 horas de incubação. As análises químicas comparando o feijão cru, caldo de feijão cozido, caldo de feijão fermentado e caldo de feijão fermentado e desidratado, mostraram poucas alterações nutricionais entre as amostras. As metodologias empregadas para a secagem do caldo tiveram a mesma influência sobre as propriedades de solubilidade e capacidade de intumescimento das partículas secas. A avaliação microbiológica classificou o produto de feijão desidratado como seguro. Foi verificada uma maior aceitabilidade desse produto quando condimentado com tempero a base de legumes.

Palavras-chave: Feijão. Estaquiose. Rafinose. Flatulência. α -galactosidase.

ABSTRACT

Beans are part of traditional foods consumed in the diet of the Brazilian population and many other countries, they constitute the main source of protein for Brazilians, followed by meat and rice. They are considered an excellent food because they provide essential nutrients such as protein, iron, calcium, zinc, magnesium and vitamins (especially B complex), carbohydrates and fibers. However, the presence of substances such as the Raffinose Family of Oligosaccharides difficult the digestibility of beans, causing the phenomenon of flatulence, which is usually attributed to lack of α -galactosidase enzyme in humans and animals. This work aimed the implementation of a biotechnological process to produce a beans broth, with reduced levels in stachyose and raffinose, responsible for flatulence. The microorganism used in the fermentative process was the *Lactobacillus agilis* LPB 56, which showed survival in the beans broth previously standardized. The statistic planning showed that the most significant variables were the temperature of incubation and use of calcium carbonate (CaCO_3). Fermentations in bioreactor are performed, using the optimal points, set at 37°C and 1.0% of CaCO_3 . The rate of inoculum used was 10% (v/v) and an agitation of 160 rpm was necessary for the homogenization of CaCO_3 . The results showed a maximum consumption of 99.3% of stachyose and 100% of raffinose present in raw beans after 18 hours of fermentation. The increase of viable cells in this period was from 2.4×10^7 CFU/mL to 7.0×10^8 CFU/mL. The highest activity of α -galactosidase enzyme was 0.162 U/mL at 6 hours of incubation. The chemical analysis comparing the raw beans, cooked beans broth, fermented beans broth and dried fermented beans broth, showed little nutritional changes among the samples. The methodologies employed for drying of the broth had the same influence on the solubility properties and swelling power of the dried particles. The microbiological evaluation rated the product of dried beans as safe. There was a greater acceptability of this product when it was tempered with vegetables sauce.

Key words: Beans. Stachyose. Raffinose. Flatulence. α -galactosidase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	– PERCENTUAL DA PARTICIPAÇÃO DO FEIJÃO NA PRODUÇÃO DE CEREAIS, LEGUMINOSAS E OLEAGINOSAS NO BRASIL.....	27
FIGURA 2	– PRODUÇÃO, ÁREA PLANTADA E RENDIMENTO DO FEIJÃO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) – SAFRAS DE 2000/2001 A 2006/2007.....	27
FIGURA 3	– CONSUMO PER CAPITA DE FEIJÃO NO BRASIL NOS ANOS DE 1972 A 2008.....	31
FIGURA 4	– RELAÇÃO ESTRUTURAL DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE.....	33
FIGURA 5	– TRATO GASTROINTESTINAL SUPERIOR E INFERIOR.....	36
QUADRO 1	– PRINCIPAIS ALIMENTOS RESPONSÁVEIS PELA FLATULÊNCIA.....	38
FIGURA 6	– MECANISMO DE PRODUÇÃO E CONSUMO DE GASES.....	39
FIGURA 7	– VOLUME DE GASES PRODUZIDOS POR 16 VOLUNTÁRIOS DURANTE 4 HORAS.....	40
QUADRO 2	– PRODUTOS OBTIDOS POR VIA FERMENTATIVA.....	42
FIGURA 8	– VIAS METABÓLICAS DE FERMENTAÇÃO DA GLICOSE (HEXOSE) POR BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	45
FIGURA 9	– ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GRUPO <i>Lactobacillus casei-Pediococcus</i>	47
QUADRO 3	– MÉTODOS DE DESIDRATAÇÃO EMPREGADOS NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA.....	53
FIGURA 10	– ESQUEMA GERAL PARA A ELABORAÇÃO DO INÓCULO.....	59
FIGURA 11	– FLUXOGRAMA DA ELABORAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO.....	60
FIGURA 12	– FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DO FEIJÃO FERMENTADO E DESIDRATADO.....	62
FIGURA 13	– BIORREATOR USADO NA FERMENTAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO.....	64
FIGURA 14	– CRESCIMENTO DAS BAL SELECIONADAS EM MRS MODIFICADO.....	74

FIGURA 15	– GALERIAS API 50 CHL (BIOMÉRIEUX) USADAS NA IDENTIFICAÇÃO DA CEPA FJ 102.....	75
FIGURA 16	– CRESCIMENTO DO <i>L. agilis</i> LPB 56 E <i>L. paracasei</i> FJ 102 EM CALDO DE FEIJÃO.....	75
FIGURA 17	– VARIAÇÃO NO TEOR DA ESTAQUIOSE EM CALDO DE FEIJÃO FERMENTADO POR BAL.....	76
FIGURA 18	– VISUALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓPTICA DO <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 (AUMENTO DE 100 X).....	77
FIGURA 19	– CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 EM MEIO MRS.....	78
FIGURA 20	– CRESCIMENTO DO <i>L. agilis</i> LPB 56 EM CALDO DE FEIJÃO (INÓCULO CULTIVADO EM MRS) (1ª ETAPA).....	79
FIGURA 21	– CRESCIMENTO DO <i>L. agilis</i> LPB 56 EM CALDO DE FEIJÃO (INÓCULO CULTIVADO CALDO DE FEIJÃO) (2ª ETAPA).....	79
FIGURA 22	– FERMENTAÇÃO DE CALDO DE FEIJÃO EM ERLLENMEYERS.....	83
FIGURA 23	– CRESCIMENTO DO <i>L. agilis</i> LPB 56 EM CALDOS DE FEIJÃO COM CONCENTRAÇÕES DE 10 E 15%.....	84
FIGURA 24	– CRESCIMENTO DO <i>L. agilis</i> LPB 56 EM CALDO DE FEIJÃO A 30 E 37°C.....	85
FIGURA 25	– CRESCIMENTO DO <i>L. agilis</i> LPB 56 EM CALDO DE FEIJÃO COM E SEM CARBONATO DE CÁLCIO.....	86
FIGURA 26	– SIGNIFICÂNCIA DAS VARIÁVEIS NO CONSUMO DA ESTAQUIOSE (DIAGRAMA DE PARETO).....	89
FIGURA 27	– SIGNIFICÂNCIA DAS VARIÁVEIS SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO (DIAGRAMA DE PARETO).....	91
FIGURA 28	– SIGNIFICÂNCIA DAS VARIÁVEIS NA ATIVIDADE DA α -GALACTOSIDASE (DIAGRAMA DE PARETO).....	93
FIGURA 29	– SIGNIFICÂNCIA DA TEMPERATURA E CARBONATO DE CÁLCIO NO CONSUMO DA ESTAQUIOSE (DIAGRAMA DE PARETO)	95
FIGURA 30	– OTIMIZAÇÃO DO CONSUMO DA ESTAQUIOSE (METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA).....	97
FIGURA 31	– CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR E VARIAÇÃO DO PH	99

FIGURA 32	– VARIAÇÃO DE NO TEOR DE AÇÚCARES E ÁCIDO LÁCTICO DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DO CALDO DE FEIJÃO.....	100
FIGURA 33	– ATIVIDADE DA α -GALACTOSIDASE E TEOR DE OLIGOSSACARÍDEOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO.....	102
FIGURA 34	– ESTUFA A VÁCUO (VACUCELL 22,55 1M)	104
FIGURA 35	– PÓ DE FEIJÃO FERMENTADO.....	104
FIGURA 36	– BALANÇA DETERMINADORA DE UMIDADE POR INFRAVERMELHO (TOP RAY).....	105
FIGURA 37	VARIAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM EM ESTUFA CONVENCIONAL (EC) E ESTUFA A VÁCUO (EV).....	105
FIGURA 38	– CURVA DE SECAGEM DO CALDO DE FEIJÃO CENTRIFUGADO E NÃO CENTRIFUGADO.....	107
FIGURA 39	– ASPECTO DO PÓ DE FEIJÃO FERMENTADO E REHIDRATADO.....	110
FIGURA 40	– CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE FEIJÃO.....	117
QUADRO 4	– ESTIMATIVA DOS CUSTOS ENVOLVIDOS NA PESQUISA.....	121

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	–	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FEIJÃO COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.), CULTIVAR IAC-CARIOCA.....	24
TABELA 2	–	ÁREA PLANTADA, PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DO FEIJÃO POR ESTADOS BRASILEIROS - SAFRAS DE 2006/2007 E 2007/2008.....	28
TABELA 3	–	CLASSIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS CARBOIDRATOS...	32
TABELA 4	–	MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS PRESENTES NO CÓLON HUMANO.....	37
TABELA 5	–	BACTÉRIAS LÁCTICAS USADAS NA ELABORAÇÃO DE PRODUTOS PROBIÓTICOS.....	46
TABELA 6	–	TEOR DE ÁGUA DE ALGUNS ALIMENTOS DESIDRATADOS.....	51
TABELA 7	–	RESULTADOS DOS TESTES DE CARACTERIZAÇÃO DAS BAL.....	73
TABELA 8	–	VARIÁVEIS E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ⁴	87
TABELA 9	–	RESULTADOS DO CONSUMO DA ESTAQUIOSE.....	87
TABELA 10	–	RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O CONSUMO DA ESTAQUIOSE.....	89
TABELA 11	–	RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO.....	90
TABELA 12	–	RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PRODUÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO.....	91
TABELA 13	–	RESULTADOS DA ATIVIDADE DA α -GALACTOSIDASE.....	92
TABELA 14	–	RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ATIVIDADE DA α -GALACTOSIDASE.....	93
TABELA 15	–	VARIÁVEIS E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ²	94
TABELA 16	–	RESULTADOS DE CONSUMO DA ESTAQUIOSE.....	94
TABELA 17	–	RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O CONSUMO DA ESTAQUIOSE.....	96
TABELA 18	–	CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NO CONSUMO DA ESTAQUIOSE.....	96

TABELA 19	–	TEOR DE UMIDADE E ATIVIDADE DE ÁGUA DO CALDO DE FEIJÃO DESIDRATADO.....	106
TABELA 20	–	SOLUBILIDADE DAS PARTÍCULAS SECAS DE FEIJÃO.....	108
TABELA 21	–	CAPACIDADE DE INTUMESCIMENTO DAS PARTÍCULAS SECAS DE FEIJÃO.....	109
TABELA 22	–	VISCOSIDADE DAS AMOSTRAS DE FEIJÃO REHIDRATADO.....	111
TABELA 23	–	TEOR DE UMIDADE E SÓLIDOS TOTAIS DAS AMOSTRAS DE FEIJÃO	113
TABELA 24	–	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS AMOSTRAS DE FEIJÃO (BASE SECA).....	113
TABELA 25	–	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DO FEIJÃO FERMENTADO E DESIDRATADO.....	119
TABELA 26	–	PERFIL DE ACEITABILIDADE DO PRODUTO REHIDRATADO.....	120
TABELA 27	–	RESULTADOS DO TESTE DE ACEITABILIDADE.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	-	por cento
α	-	alfa
pH	-	potencial hidrogeniônico
HPLC	-	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
EMBRAPA	-	<i>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária</i>
°C	-	graus Celsius
CIF	-	<i>Centro de Inteligência do Feijão</i>
FAO	-	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
kg	-	quilograma
ha	-	hectare
CNPAF	-	<i>Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão</i>
CONAB	-	<i>Companhia Nacional de Abastecimento</i>
ONDs	-	oligossacarídeos não digeríveis
GOS	-	galacto-oligossacarídeos
mL	-	mililitro
H ₂	-	hidrogênio
CO ₂	-	dióxido de carbono
CH ₄	-	metano
L	-	levorotatório
g	-	grama
g/kg	-	grama por quilograma
mmHg	-	milímetro de mercúrio
O ₂	-	oxigênio
N ₂	-	nitrogênio
H ₂ S	-	sulfeto de hidrogênio
MES	-	metanodiol
DMS	-	dimetil sulfeto
D	-	dextrorotatório
C ₃ H ₆ O ₃	-	ácido 2-hidroxipropanóico
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
BAL	-	bactéria ácido láctica
EMP	-	Embden-Meyerhof-Parnas

L.	-	<i>Lactobacillus</i>
UR	-	umidade relativa do ar
P.A.	-	<i>Pro Analyse</i>
MRS	-	meio <i>Man, Rogosa e Sharp</i>
rpm	-	rotações por minuto
H ₂ SO ₄	-	ácido sulfúrico
μL	-	microlitro
v/v	-	volume por volume
p/v	-	peso por volume
UFC	-	unidades formadoras de colônias
±	-	mais ou menos
nm	-	nanômetro
psi	-	libra por polegada quadrada
atm	-	atmosfera
min	-	minuto
CaCO ₃	-	carbonato de cálcio
μm	-	micrômetro
pNPGal	-	p-nitrofenil-α-D-galatopiranosídeo
mM	-	milimolar
mg	-	miligrama
M	-	molar
μmol	-	micromol
cm	-	centímetro
mm	-	milímetro
Aw	-	atividade de água
cP	-	centipoise
AOAC	-	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
N	-	normal
HCl	-	ácido clorídrico
NaOH	-	hidróxido de sódio
RDC	-	<i>Resolução da Diretoria Colegiada</i>
sp.	-	espécie

FJ 102	-	bactéria láctica do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos
LPB 56	-	bactéria láctica do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos
g/L	-	gramas por litro
h	-	hora
D.O.660	-	densidade óptica a 660 nm
$C_6H_{12}O_6$	-	molécula de hexose (açúcar)
<i>B.</i>	-	<i>Bifidobacterium</i>
U	-	unidade internacional de atividade enzimática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 OBJETIVO GERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 O FEIJÃO	23
2.1.1 Digestibilidade do Feijão	25
2.1.2 Importância econômica do feijão	26
2.2 OLIGOSSACARÍDEOS	32
2.2.1 Oligossacarídeos da Família Rafinose	33
2.2.2 Digestibilidade dos oligossacarídeos	35
2.3 Produção de gases ou flatulência	38
2.4 PRODUTOS OBTIDOS POR PROCESSOS FERMENTATIVOS	41
2.4.1 Fermentação de alimentos	42
2.5 FERMENTAÇÃO LÁCTICA.....	43
2.5.1 Ácido láctico	43
2.5.2 Bactérias ácido lácticas (BAL).....	43
2.5.2.1 Ação probiótica das BAL.....	46
2.5.2.2 <i>Lactobacillus agilis</i>	47
2.6 ENZIMA α -GALACTOSIDASE	48
2.6.1 Produção da α -galactosidase por BAL	49
2.6.2 Aplicação tecnológica da α -galactosidase.....	50
2.7 DESIDRATAÇÃO DE ALIMENTOS	50
2.7.1 Métodos de desidratação	53
2.7.1.1 Secagem por condução	53
2.7.1.1.1 Secadores a vácuo.....	54
2.8 RECONSTITUIÇÃO DOS ALIMENTOS DESIDRATADOS.....	54
3 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS	55
3.1.1 Meios de cultivo e reagentes analíticos.....	55
3.1.2 Padrões HPLC	55
3.1.3 Equipamentos	56

3.2	MICRORGANISMOS	56
3.2.1	Isolamento e caracterização.....	57
3.2.2	Manutenção das cepas	58
3.2.3	Seleção e identificação das cepas	58
3.3	ELABORAÇÃO DO INÓCULO	58
3.3.1	Padronização do pré-inóculo.....	59
3.3.2	Padronização do inóculo	59
3.4	PREPARO DO MEIO DE CULTIVO (CALDO DE FEIJÃO).....	60
3.5	FERMENTAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO.....	61
3.6	VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NO CONSUMO DA ESTAQUIOSE E DA RAFINOSE.....	62
3.6.1	Influência da concentração do caldo	63
3.6.2	Influência da temperatura.....	63
3.6.3	Influência do carbonato de cálcio	63
3.6.4	Otimização das variáveis.....	63
3.7	FERMENTAÇÕES EM ERLLENMEYERS E BIORREATOR	64
3.7.1	Quantificação dos oligossacarídeos da Família Rafinose e do ácido láctico.....	65
3.7.2	Atividade da α -galactosidase	65
3.8	SECAGEM DO CALDO FERMENTADO.....	65
3.8.1	Uso da centrifugação	66
3.9	ANÁLISES FÍSICAS.....	66
3.9.1	Solubilidade e capacidade de intumescimento.....	66
3.9.2	Determinação da viscosidade após a rehidratação.....	67
3.10	ANÁLISES QUÍMICAS	67
3.10.1	Determinação da umidade e sólidos totais.....	67
3.10.2	Determinação de proteínas	68
3.10.3	Determinação de lipídios	69
3.10.4	Determinação das cinzas	69
3.10.5	Determinação da fibra bruta	69
3.10.6	Determinação dos carboidratos totais	70
3.10.6.1	Determinação da estaquiose e rafinose e do ácido láctico	70
3.10.7	Análise estatística	71
3.11	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	71

3.12 ANÁLISE SENSORIAL.....	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS	73
4.2 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS	74
4.2.1 Seleção da BAL cultivada em caldo de feijão.....	75
4.2.2 <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56.....	77
4.3 ELABORAÇÃO DO INÓCULO	78
4.3.1 Padronização do pré-inóculo.....	78
4.3.2 Padronização do inóculo	79
4.4 PREPARO DO CALDO DE FEIJÃO.....	80
4.4.1 Uso do carbonato de cálcio	82
4.5 FERMENTAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO.....	83
4.5.1 Influência da concentração do caldo de feijão.....	83
4.5.2 Influência da temperatura.....	84
4.5.3 Influência do carbonato de cálcio	85
4.6 OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NO CONSUMO DA ESTAQUIOSE E RAFINOSE	86
4.6.1 Determinação das variáveis significativas	87
4.6.1.1 Consumo da estaquiose	87
4.6.1.2 Produção do ácido láctico.....	90
4.6.1.3 Atividade da α -galactosidase	92
4.6.2 Otimização das variáveis.....	94
4.6.2.1 Consumo da estaquiose	94
4.7 FERMENTAÇÕES OTIMIZADAS DO CALDO DE FEIJÃO	98
4.7.1 Crescimento em frascos e biorreator	98
4.7.2 Análise dos açúcares e do ácido láctico.....	99
4.7.3 Determinação da atividade da α -galactosidase.....	102
4.8 SECAGEM DO CALDO DE FEIJÃO FERMENTADO	103
4.8.1 Uso da centrifugação	107
4.9 ANÁLISES FÍSICAS.....	108
4.9.1 Solubilidade.....	108
4.9.2 Capacidade de intumescimento	109
4.9.3 Determinação da viscosidade após a rehidratação.....	109
4.10 ANÁLISES QUÍMICAS	113

4.10.1 Umidade	114
4.10.2 Proteína.....	114
4.10.3 Lipídios totais	115
4.10.4 Cinzas	115
4.10.5 Fibra bruta	116
4.10.6 Carboidratos totais	116
4.10.6.1 Estaquiose e rafinose	117
4.11 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	118
4.12 ANÁLISE SENSORIAL.....	119
4.13 ANÁLISE DE CUSTOS DO PROCESSO.....	121
5 CONCLUSÕES.....	124
REFERÊNCIAS.....	125
APÊNDICES.....	145

1 INTRODUÇÃO

Os legumes desempenham um papel importante na dieta tradicional de muitos países. O aumento no consumo desses alimentos tem sido associado ao fato de terem um baixo conteúdo de gordura e serem excelente fonte de proteínas, fibras e uma variedade de micronutrientes e fitoquímicos (MESSINA, 1999). Diversos trabalhos científicos têm demonstrado os benefícios da ingestão das leguminosas na prevenção de dislipidemias, diabetes, câncer de cólon e osteoporose.

De acordo com Oboh (1998) as leguminosas contêm duas vezes mais proteínas em comparação aos cereais. No entanto, o valor biológico desses componentes pode ser limitado pela presença de fatores antinutricionais. Algumas substâncias consideradas antinutricionais, geralmente encontradas em alimentos vegetais são os taninos (compostos fenólicos) e o ácido fítico. Segundo Torre, Rodriguez e Saura-Calixto (1991) sob condições fisiológicas, o ácido fítico é fortemente ionizado podendo interagir com proteínas e íons metálicos. Muitos desses complexos formados são insolúveis e biologicamente indisponíveis. Além disso, o fósforo no fitato é considerado indisponível devido à limitada capacidade de espécies monogástricas de hidrolisarem esse composto no intestino delgado (MUZQUIZ *et al.*, 1999). Já os taninos podem complexar-se às proteínas causando inibição de algumas enzimas (NACZK *et al.*, 1994).

As lectinas são proteínas naturais, de origem não imune, que podem se ligar a glicocomponentes da superfície celular por ligações específicas a carboidratos (MONTEIRO *et al.*, 1998). Estas substâncias estão largamente distribuídas em sementes de leguminosas, podendo interferir na sua biodisponibilidade.

Outros compostos presentes nas leguminosas são os oligossacarídeos da Família Rafinose. Esses açúcares não são digeridos pelo organismo humano, no entanto, eles vêm sendo empregados como ingrediente na indústria de alimentos, já que agem como reguladores metabólicos e substratos energéticos indiretos para as bactérias anaeróbicas do cólon. Segundo Tomomatsu (1994) a ingestão diária recomendada para os oligossacarídeos da soja é de 2 gramas.

Entretanto, o consumo excessivo dos oligossacarídeos da Família Rafinose pode levar a produção da flatulência, que é ocasionada pela falta de atividade da enzima α -galactosidase, necessária para hidrolisar as ligações α -1,6 desses açúcares. Os oligossacarídeos, quando ingeridos, passam pelo intestino grosso e

são anaerobicamente fermentados, com produção de gases como hidrogênio, dióxido de carbono e metano. Além da flatulência, esses gases causam diarreia e dor abdominal em humanos e animais (SÁNCHEZ-MATA *et al.*, 1998).

Dentre as leguminosas frequentemente consumidas estão o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glycine max*) e o feijão de corda (*Vigna unguiculata*). O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é um legume consumido em muitos países e representa uma importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras e micronutrientes (ACEVEDO; VELASQUE-CORONADO; BRESSANI, 1994). O baixo conteúdo em aminoácidos sulfurados é complementado pelo arroz, constituindo a principal refeição da população brasileira. No entanto, a presença dos oligossacarídeos da Família Rafinose é um dos fatores que vem limitando o consumo do feijão.

Estratégias vêm sendo extensivamente testadas para a remoção desses açúcares flatulentos de sementes de leguminosas. De acordo com Calloway, Hickey e Murphy (1971) operações como a extração aquosa ou alcoólica, mudanças no pH, umidade ou temperatura, no preparo de legumes, podem diminuir a ocorrência da flatulência. Alguns processos como maceração, cozimento, germinação, tratamentos com irradiação gama e α -galactosidases microbianas ou de plantas são alternativas que vêm sendo usadas para reduzir o conteúdo de oligossacarídeos em legumes (GUIMARÃES *et al.*, 2001; MACHAIAH; PEDNEKAR, 2002). Segundo Mansour e Khalil (1995) as técnicas mais eficientes na eliminação dos oligossacarídeos da Família Rafinose foram a germinação e a fermentação devido a produção da enzima α -galactosidase.

A fermentação ácido láctica é uma alternativa que vem sendo usada como forma de preservação de vegetais, tendo importância pela manutenção ou melhora da segurança, propriedades nutricionais e sensoriais e aumento da vida útil dos vegetais (BUCKENHÜSKES, 1997). Apesar de um grande número de bactérias lácticas serem geralmente utilizadas em fermentações de laticínios e de carne, poucas culturas vem sendo empregadas em fermentações vegetais.

Considerando a importância econômica mundial do feijão, aliado às suas propriedades nutricionais e funcionais, e o freqüente problema da digestibilidade dessa leguminosa, este trabalho teve o propósito de estudar a aplicação de um processo biotecnológico ao feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.), utilizando uma bactéria ácido láctica selecionada, com forte capacidade de metabolização dos

oligossacarídeos da Família Rafinose, visando, dessa forma, a diminuição na ocorrência da flatulência.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo biotecnológico para produzir um feijão desidratado com teor reduzido em oligossacarídeos da Família Rafinose, os quais são responsáveis pelo fenômeno da flatulência em humanos e animais.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o crescimento de uma bactéria ácido láctica selecionada em caldo de feijão.
- 2) Analisar o consumo de oligossacarídeos da Família Rafinose (estaquiose e rafinose) e produção de ácido láctico através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) no caldo de feijão fermentado.
- 3) Otimizar parâmetros de fermentação como temperatura de incubação, taxa de inóculo, uso da agitação e uso de agente regulador de acidez (CaCO_3).
- 4) Realizar cinéticas de fermentação em biorreator comparando com a fermentação em erlenmeyers.
- 5) Estudar diferentes métodos de secagem a fim de aumentar a estabilidade do caldo de feijão fermentado.
- 6) Estabelecer uma metodologia para a rehidratação do produto seco.
- 7) Analisar as alterações físico-químicas antes e após os processos de fermentação e secagem.
- 8) Avaliar a qualidade microbiológica do produto final.
- 9) Verificar a aceitabilidade do produto fermentado e reidratado através de análise sensorial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O FEIJÃO

Segundo pesquisadores a origem do feijão foi no Continente Americano. O feijão era também cultivado no Antigo Egito e na Grécia, onde recebia homenagens, por ser considerado símbolo da vida. Os antigos romanos usavam o feijão nas festas e até mesmo como forma de pagamento para as apostas. A explicação da disseminação dessa leguminosa é atribuída às grandes guerras, visto que o feijão era parte fundamental da dieta dos guerreiros (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA), 2008).

O feijão pertence a divisão *Fanerogamae*, sub-divisão *Angiospermae*, classe *Dicotyledoneae*, ordem *Rosales*, família *Leguminosae*, sub-família *Papilionoideae*, gênero *Phaseolus*, espécie *Phaseolus vulgaris* L. (MECHI; CANIATTI-BRAZACA; ARTHUR, 2005). Dentre os elementos climáticos que mais influenciam a produção do feijão estão a temperatura, precipitação pluvial e a radiação solar. A temperatura é a que exerce maior influência por auxiliar no florescimento e na frutificação do feijoeiro. A susceptibilidade do feijão à deficiência hídrica ocorre durante a floração e estágio inicial de formação de vagens, sendo que o período crítico se situa 15 dias antes da floração. Devido a diversidade climática em todo o território brasileiro o cultivo do feijão é limitado no Norte e inviável na Região Sul, na época de inverno, onde a temperatura chega a 0°C (SILVA; STEINMETZ, 2003).

O feijão faz parte dos alimentos tradicionais consumidos na dieta da população brasileira, tendo importância por seu conteúdo energético e protéico. Constitui-se da principal fonte de proteína dos brasileiros, seguido pela carne bovina e pelo arroz (LAJOLO; GENOVESE; MENEZES, 1996). O feijão é considerado um excelente alimento porque fornece nutrientes essenciais ao ser humano, como proteínas, ferro, cálcio, vitaminas, carboidratos, fibras e o aminoácido essencial lisina (RESENDE *et al.*, 2008). Devido ao seu baixo custo em relação às proteínas de origem animal, o feijão é considerado uma excelente alternativa para o incremento da qualidade nutricional, sendo muitas vezes utilizado em substituição a carne e outros alimentos protéicos.

Os grãos de feijão possuem em média 20 a 25% de proteína, 1 a 20% de fibras alimentares, 60 a 65% de carboidratos, 1 a 3% de lipídios (GEIL; ANDERSON, 1994). Contudo, os teores de aminoácidos essenciais das proteínas do feijão são baixos como por exemplo, os aminoácidos sulfurados, metionina, cisteína, cistina e triptofano (SGARBIERI, 1996). A composição em ácidos graxos dos lipídios do feijão comum é bastante variável, com quantidade substancial de ácidos graxos insaturados (REYES-MORENO; PAREDES-LOPEZ, 1993). Os ácidos graxos insaturados representam cerca de 65 a 87% do total dos lipídios do feijão e os mais freqüentes são o ácido oléico (7 a 10%), o linoléico (21 a 28%) e o α -linolênico (37 a 54%) (CHIARADIA; GOMES, 1997). Além disso, o feijão comum tem um elevado conteúdo de minerais essenciais e baixo teor de sódio (SGARBIERI, 1989).

A composição centesimal do feijão comum *Phaseolus vulgaris* é mostrada na TABELA 1.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FEIJÃO COMUM (*PHASEOLUS VULGARIS*, L.), CULTIVAR IAC-CARIOCA

Componentes	Quantidade (g/100g)
Umidade	9,4
Proteínas	18,4
Lipídeos totais	2,3
Cinzas	0,6
Fibras	4,6
Carboidratos totais	64,7
Rafinose*	0,4
Estaquiose*	3,23
Verbascose*	0,12

FONTE: ADAPTADO DE OLIVEIRA *et al.* (2001).

NOTA: * Oligossacarídeos da Família Rafinose, incluídos na fração dos carboidratos totais.

No Brasil a espécie mais cultivada é a do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Dentre outras espécies plantadas no país estão o feijão-azuki (*Vigna angularis*), cultivado pelos imigrantes japoneses; o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), usado como adubo verde; o feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.), consumido como grãos verdes; e o feijão caupi ou feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), que constitui a alimentação básica da população do Nordeste (CENTRO DE

INTELIGÊNCIA DO FEIJÃO (CIF), 2008). As variedades de feijão cultivadas no Brasil estão no APÊNDICE 1.

Alguns dos efeitos benéficos atribuídos ao consumo do feijão estão associados às fibras alimentares, que ajudam na prevenção de doenças cardiovasculares e do trato intestinal, além de diabetes e câncer de cólon (HUGHES, 1991).

Estudos avaliando o consumo do feijão afirmam que a ingestão de média a alta quantidade de feijão pode ajudar a reduzir o desenvolvimento de doenças como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e neoplasias. Madhujith e Shahidi (2005) atribuem aos feijões de cor terem uma importante função contra o estresse oxidativo, o que pode estar associado a presença de polifenóis com atividade antioxidante comprovada *in vitro*. Segundo os mesmos autores, os antioxidantes eliminam os radicais livres e espécies que reagem com o oxigênio, prevenindo, dessa forma, os danos oxidativos ao DNA e as transformações celulares que levam às doenças degenerativas.

Foi relatado por Tsuda *et al.* (1994) que as antocianinas, constituintes do feijão preto, poderiam ser responsáveis pelo efeito protetor aos danos no DNA por ser altamente reativo aos radicais livres. Azevedo *et al.* (2003) estudaram os efeitos antimutagênicos do feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L. – Ouro Preto), quando camundongos foram alimentados com dietas suplementadas contendo 1, 10 e 20% de farelo de feijão preto previamente cozido e desidratado. Eles observaram uma diminuição na frequência de eritrócitos policromáticos multinucleados da medula óssea, induzidos por um agente de mutagênico (ciclofosfamida), independente da concentração de feijão utilizado. Dados similares foram obtidos nas lesões no DNA em leucócitos.

2.1.1 Digestibilidade do Feijão

O feijão é um alimento com alto valor protéico. No entanto, a digestibilidade das proteínas é inferior quando comparada às proteínas de origem animal. Isso ocorre devido aos baixos teores em aminoácidos essenciais, particularmente os sulfurados, metionina, cisteína e cistina, além do tripfano (SGARBIERI, 1996). Estudos *in vitro* avaliando a digestibilidade de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) demonstraram que esta situou-se entre 76,8 e 84,1%. O aumento na pigmentação

do grão ocasionou uma diminuição na digestibilidade. Isso pode ser atribuído ao fato de que os pigmentos são, em geral, compostos fenólicos, os quais podem interagir com proteínas do feijão, interferindo na sua biodisponibilidade (AW; SWANSON, 1985).

A dificuldade na digestão do grão também pode ser associada a substâncias de natureza antinutricional como os inibidores de proteases e de amilases, lectinas, taninos, fitatos, oligossacarídeos da Família Rafinose (rafinose, estaquiose e verbascose). Um processo utilizado para melhorar a digestibilidade é o tratamento térmico, que tem a função de inativar os inibidores de proteases do feijão (ANTUNES *et al.*, 1995).

Os oligossacarídeos da Família Rafinose têm relação direta com a ocorrência da flatulência, influenciando negativamente o consumo do feijão. Estes açúcares contêm ligações α -galactosídicas, que não são hidrolisadas por enzimas humanas e animais, isso possibilita às bactérias do trato intestinal a metabolização desses açúcares, com conseqüente produção de dióxido de carbono, hidrogênio e metano, levando a incidência da flatulência (IYER *et al.*, 1980; VIDAL-VALVERDE; FRIAS; VALVERDE, 1993). Outros sintomas que também podem ser decorrentes são náuseas, câimbras, dores abdominais (CRISTOFARO; MATTU; WUHRMANN, 1974), diarréias, dores de cabeça, confusão mental e diminuição da capacidade de concentração no trabalho (SANNI; ONILUDE; OGUNDOYE, 1997).

Contraditoriamente, muitos estudos vêm demonstrando também efeitos positivos da ingestão dessas substâncias consideradas antinutricionais. O ácido fítico e os compostos fenólicos, por exemplo, quando consumidos em baixas concentrações mostraram ação protetora contra o câncer, auxiliando também na prevenção de doenças cardiovasculares (SHAHIDI, 1997).

2.1.2 Importância econômica do feijão

O feijão representa uma importante fonte protéica, particularmente nas Américas (47% da produção mundial) e no leste e sul da África (10% da produção mundial) (YOKOYAMA, 2003). Esse legume é cultivado em mais de 100 países, estando 63% da produção concentrada em apenas 5 países (FERREIRA, 2008) dentre os quais se encontram o Brasil, Índia, China, Estados Unidos e México (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO), 2005).

No Brasil o feijão se encontra entre os principais itens produzidos, com participação na produção de cereais, leguminosas e oleaginosas (FIGURA 1).

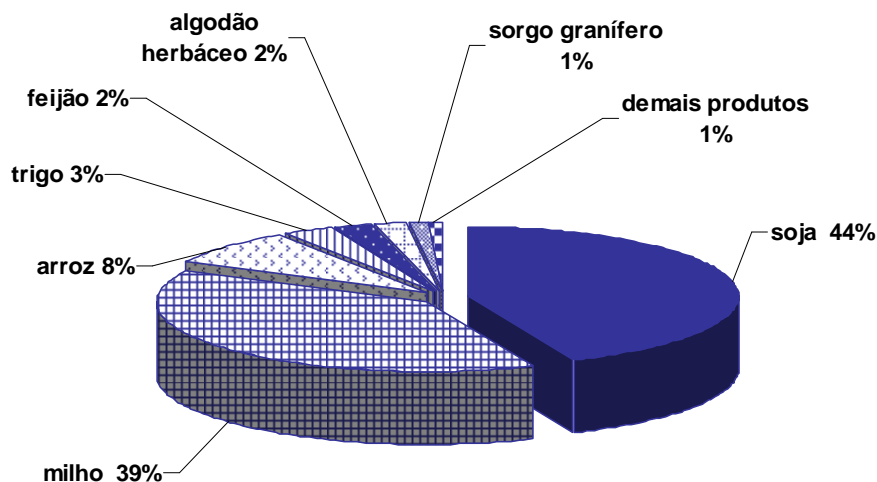


FIGURA 1 – PERCENTUAL DA PARTICIPAÇÃO DO FEIJÃO NA PRODUÇÃO DE CEREAIS, LEGUMINOSAS E OLEAGINOSAS NO BRASIL

FONTE: IBGE (2007)

O Brasil destaca-se como maior produtor e consumidor de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor nacional, com aproximadamente 15% do total produzido (CIF, 2008). A variação na produção brasileira de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) das safras de 2000/2001 a 2006/2007 é mostrada na FIGURA 2.

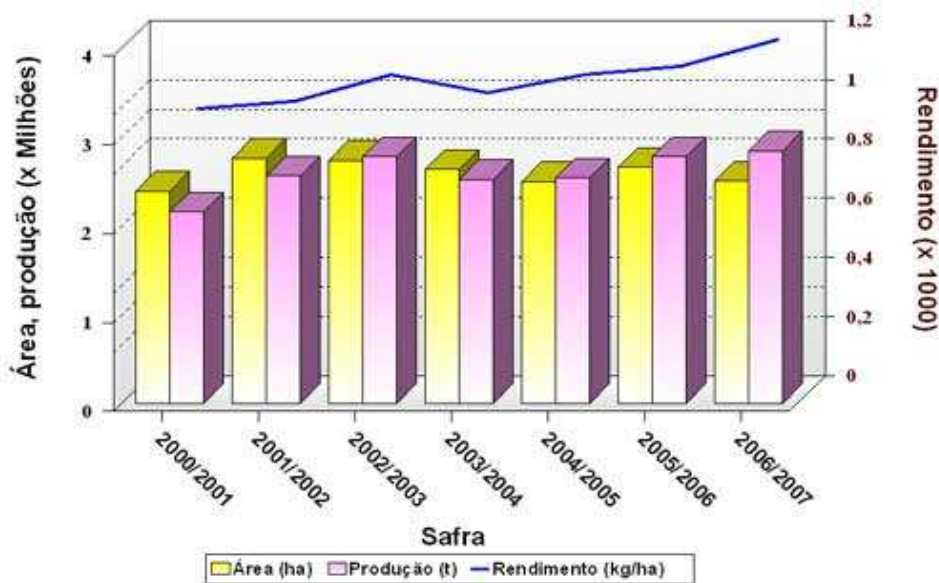


FIGURA 2 – PRODUÇÃO, ÁREA PLANTADA E RENDIMENTO DO FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) – SAFRAS DE 2000/2001 A 2006/2007

FONTE: SILVA (2007) *apud* IBGE (2008)

Dentre os maiores estados produtores estão Paraná, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Goiás (ARAGÃO; VIANNA; RECH, 2008). A TABELA 2 mostra volume de produção dos principais estados produtores brasileiros.

TABELA 2 – ÁREA PLANTADA, PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DO FEIJÃO POR ESTADOS BRASILEIROS - SAFRAS DE 2006/2007 E 2007/2008

UF	Área (mil ha)			Produção (mil t)			Produtividade (kg/ha)		
	06/07	07/08	Var. %	06/07	07/08	Var. %	06/07	07/08	Var. %
NORTE	178,0	156,0	(12,4)	136,6	114,8	(16,0)	767	736	(4,2)
Roraima	1,0	1,0	-	0,7	0,7	-	664	667	0,4
Rondônia	61,1	62,0	1,4	41,2	43,1	4,6	675	695	3,0
Acre	15,0	5,7	(62,3)	8,2	2,8	(65,9)	545	501	(8,1)
Amazonas	6,7	4,2	(36,9)	6,0	3,6	(40,0)	900	854	(5,1)
Amapá	1,4	1,4	0,7	1,1	1,0	(9,1)	775	696	(10,1)
Pará	79,9	71,4	(10,6)	67,5	58,1	(13,9)	845	813	(3,7)
Tocantins	12,9	10,3	(19,9)	11,9	5,5	(53,8)	921	532	(42,3)
NORDESTE	2.255,0	2.229,0	(1,2)	801,4	1.126,9	40,6	355	506	42,2
Maranhão	86,8	85,8	(1,1)	39,5	40,4	2,3	455	471	3,7
Piauí	218,1	230,9	5,9	42,0	82,6	96,7	193	358	85,7
Ceará	563,2	590,1	4,8	124,6	280,0	124,7	221	474	114,5
R.G. do Norte	80,1	73,5	(8,3)	32,1	37,4	16,5	401	509	26,9
Paraíba	214,3	208,5	(2,7)	49,3	113,2	129,6	230	543	136,1
Pernambuco	310,8	306,9	(1,3)	114,2	142,1	24,4	367	463	26,0
Alagoas	99,6	105,0	5,4	47,6	52,5	10,3	478	500	4,6
Sergipe	46,9	47,3	0,9	29,5	28,6	(3,1)	630	605	(4,0)
Bahia	635,2	581,1	(8,5)	322,6	350,1	8,5	508	603	18,6
CENTRO-OESTE	210,2	192,4	(8,5)	411,4	383,2	(6,9)	1.957	1.992	1,8
Mato Grosso	40,4	49,3	22,1	67,1	73,9	10,1	1.661	1.499	(9,8)
Mato Grosso do Sul	21,5	16,9	(21,4)	26,6	19,5	(26,7)	1.238	1.153	(6,8)
Goiás	130,0	106,9	(17,8)	271,4	241,6	(11,0)	2.087	2.261	8,3
Distrito Federal	18,3	19,3	5,6	46,3	48,2	4,1	2.534	2.501	(1,3)

Continua

UF	Área (mil ha)			Produção (mil t)			Produtividade (kg/ha)		
	06/07	07/08	Var. %	06/07	07/08	Var. %	06/07	07/08	Var. %
SUDESTE	634,3	610,3	(3,8)	839,8	817,5	(2,7)	1.324	1.340	1,2
Minas Gerais	413,6	410,7	(0,7)	503,5	535,8	6,4	1.217	1.305	7,2
Espírito Santo	21,6	21,1	(2,4)	16,7	17,2	3,0	775	818	5,5
São Paulo	192,3	172,7	(10,2)	313,9	259,7	(17,3)	1.633	1.504	(7,9)
Rio de Janeiro	6,8	5,7	(15,6)	5,7	4,8	(15,8)	839	829	(1,1)
SUL	810,3	710,0	(12,4)	1.150,5	1.058,2	(8,0)	1.420	1.491	5,0
Paraná	563,3	507,2	(10,0)	795,3	780,3	(1,9)	1.412	1.538	9,0
Santa Catarina	127,4	106,5	(16,4)	208,9	179,2	(14,2)	1.640	1.683	2,6
R.G. do Sul	119,6	96,3	(19,5)	146,3	98,7	(32,5)	1.223	1.026	(16,1)
TOTAL	4.087,8	3.897,6	(4,7)	3.339,7	3.500,6	4,8	817	898	9,9

FONTE: CONAB – CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO FEIJÃO (CIF) (2008)

O cultivo do feijão no Brasil é favorecido por sua adaptação em ecossistemas tropicais e temperados e diversos tipos de solo. Devido a esta característica, o feijão pode ser cultivado em três épocas diferentes, que são conhecidas como a safra “das águas”, que ocorre de agosto a novembro, predominantemente na região Sul; a safra “da seca”, realizada de janeiro a março, na maioria dos estados produtores; e a safra “de inverno”, que abrange de abril a julho nas regiões Centro-Oeste e Sudeste. As duas primeiras safras são responsáveis por 90% da produção nacional concentrada em 2,9 milhões de hectares de produtores de pequeno a médio porte. Os 10% restantes provêm de lavouras altamente especializadas, e ocupam áreas de aproximadamente 156.000 hectares. Nesse sistema os rendimentos alcançados podem ser de até 3.000 kg.ha⁻¹ (EMBRAPA, 2008).

No Brasil, a produção de feijão se concentra nos pequenos produtores. Aproximadamente 80% da produção e da área de cultivo do feijão estão em propriedades menores que 100 hectares (ARAGÃO; VIANNA; RECH, 2008). O feijão é considerado um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social devido à mão-de-obra empregada durante o ciclo de cultura. Em Minas Gerais, cerca

de 7 milhões de homens por dia/ciclo de produção são empregados no cultivo do feijão, envolvendo aproximadamente 295.000 produtores (WANDER; RAMALHO; ANDRADE, 2005).

Na década de 90, foram colhidos em média no Brasil 3,5 milhões de toneladas por ano, sendo que, 2,7 milhões eram de feijão comum, como feijão do tipo Carioca (1,6 milhões), do grupo comercial preto (0,6 milhão) e o restante de outros tipos (0,5 milhão) (FERREIRA; DEL PELOSO; FARIA, 2002). Já o levantamento da safra de 2003/2004 da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (2005) apontou uma produção de mais de 3 milhões de toneladas, com uma produtividade média de 700 kg.ha⁻¹.

De acordo com a CONAB (2008) a produção do feijão cores representa 63% do volume produzido no Brasil, ficando o feijão preto com 18% e o macaçar com 19% do total de feijão produzido. No entanto, a produção nacional de feijão é deficitária, necessitando da importação de 100 mil toneladas por ano, sendo que, a maior parte é de feijão preto, seguido pelo feijão cores e 1% sendo destinado para outros tipos de feijão. Os principais países que exportam para o Brasil são Argentina, Chile, Estados Unidos e Bolívia (REIS, 2006).

O Brasil é também o maior consumidor de feijão, com consumo estimado em 16 kg/ano por habitante (CIF, 2008; EMBRAPA-CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ E FEIJÃO (CNPAP), 2008). Entretanto, de acordo com Ferreira, Del Peloso e Faria (2002) o consumo de feijão vem diminuindo nos últimos quarenta anos, passando de 20 kg/habitante na década de 70 para 16 kg/habitante na década de 90. Segundo Wander, Ramalho e Andrade (2005) o consumo *per capita* de feijão no Brasil passou por uma redução de 12%, passando de 18,5 kg/ano em 1975 para 16,3 kg/ano em 2002.

O gráfico apresentado na FIGURA 3 mostra consumo per capita do feijão no Brasil de 1972 a 2008.

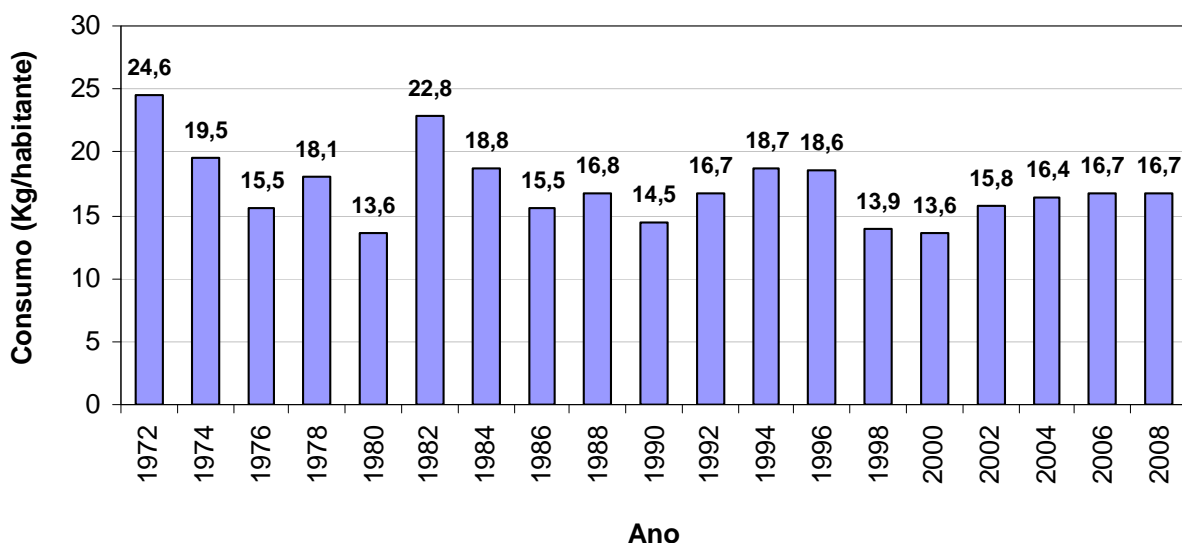


FIGURA 3 – CONSUMO PER CAPITA DE FEIJÃO NO BRASIL NOS ANOS DE 1972 A 2008

FONTE: CONAB (2008)

Essa redução no consumo do feijão poderia estar associada ao melhor acesso da população a produtos de origem animal, principalmente a carne bovina. Como forma de complementação da dieta, essa leguminosa poderia estar sendo substituída por outras fontes protéicas. Esse fato ressalta a importância do feijão como alimento, já que com o maior consumo de proteínas de origem animal verificou-se também um aumento no número de doenças degenerativas. Vários estudos têm comprovado os efeitos benéficos do feijão como parte da dieta, reforçando ainda mais a importância dessa leguminosa, que mostra-se como uma alternativa em casos de hipertensão, obesidade entre outros.

Dentre algumas características que podem determinar o consumo do feijão estão a cor, o tamanho e o brilho do grão. O halo pode influenciar na sua comercialização. A maior aceitabilidade é pelos grãos menores e opacos (AIDAR, 2003).

No Brasil o consumo do feijão preto se concentra em maior parte nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, abrangendo em menor escala, o Paraná, Santa Catarina e Espírito Santo. O feijão preto representa 17% dos feijões consumidos no Brasil (SEIJAS *et al.*, 2007). O feijão cores é mais consumido nos estados centrais, em parte do Paraná e Santa Catarina. O feijão macaçar é tipicamente consumido na Região Nordeste (CONAB, 2008).

2.2 OLIGOSSACARÍDEOS

Os carboidratos são classificados de acordo com o seu grau de polimerização (número de unidades monossacarídicas combinadas) em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (OETTERER; SARMENTO, 2006) (TABELA 3). Os oligossacarídeos contêm entre 3 e 10 moléculas sacarídicas, são solúveis em água e cerca de 0,3 a 0,6 vezes mais doces que a sacarose. A doçura está relacionada à estrutura química, grau de polimerização dos oligossacarídeos presentes e conteúdo de mono e dissacarídeos na mistura. Eles também possuem propriedades umectantes e alteram a temperatura de congelamento dos alimentos. Não se ligam a minerais e são facilmente incorporados em alimentos processados (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

TABELA 3 – CLASSIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS CARBOIDRATOS

Maiores classes (Grau de polimerização)	Sub-grupos (tipos de monossacarídeos e ligações α e β)
Açúcares (1-2)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Monossacarídeos: glicose, frutose ▪ Dissacarídeos: sacarose, maltose, trealose, lactose ▪ Açúcares alcoólicos: sorbitol, maltitol, lactitol, xilitol
Oligossacarídeos (3-10)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Malto-oligossacarídeos (α-glucano) ▪ Outros oligossacarídeos (ONDs): fruto-oligossacarídeos galacto-oligossacarídeos
Polissacarídeos (>10)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Amido (α-glucanos) ▪ polissacarídeos não amiláceos

FONTE: CUMMINGS *et al.* (1997)

Os oligossacarídeos de origem alimentícia são produzidos através de processos enzimáticos, com exceção dos oligossacarídeos da soja, que são extraídos diretamente, e a lactulose, que é produzida através de uma reação catalisada por álcali (SURESH; RITU; RAVISHANKAR, 2006).

Os oligossacarídeos podem ser classificados em 11 grupos dentre os quais se encontram os galacto-oligossacarídeos, lactulose, lactosacarose, palatinose (isomaltulose), glicosil sacarose, malto-oligossacarídeos, ciclodextrinas, gentio-

oligossacarídeos, oligossacarídeos da soja, isomalto-oligossacarídeos, xylo-oligossacarídeos (SURESH; RITU; RAVISHANKAR, 2006). Dentro do grupo de oligossacarídeos da soja estão os oligossacarídeos da Família Rafinose que vêm sendo relatados como a maior causa de flatulência.

2.2.1 Oligossacarídeos da Família Rafinose

Os oligossacarídeos da Família Rafinose, representados pela rafinose, estaquiose e verbascose, são açúcares de baixo peso molecular que contêm um ou mais grupos α -D-galactopiranosil na sua estrutura (CRISTOFARO; MATTU; WUHMANN, 1974). Na estrutura dos oligossacarídeos a sacarose é a unidade básica e pode conter um ou mais grupos α -D-galactopiranosil (α -D-Gal), sendo que as unidades de α -galactosil estão sempre do lado esquerdo da sacarose, ligadas ao carbono 6 da molécula de glicose (DEY, 1985; SILVA *et al.*, 1992) (FIGURA 4).

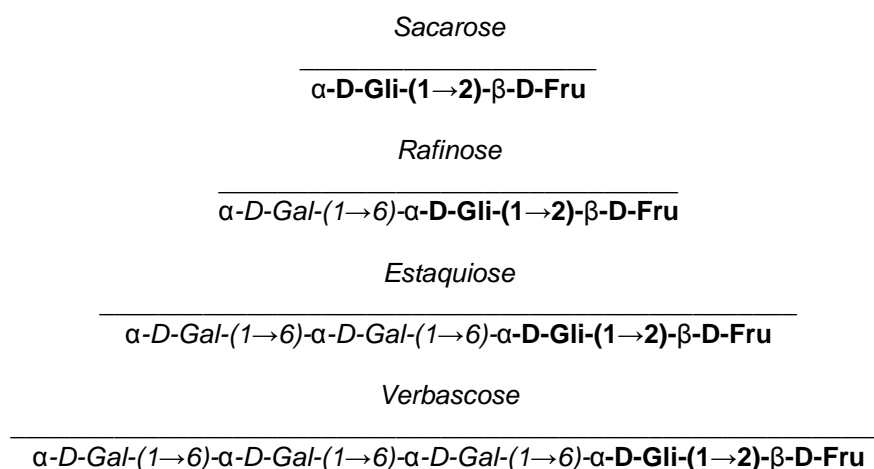


FIGURA 4 - RELAÇÃO ESTRUTURAL DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE

FONTE: SILVA *et al.* (1992)

A rafinose é um trissacarídeo ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$) constituído por uma molécula de galactose, uma de glicose e outra de frutose. É conhecida também como gossipose, melitose, melitriose e α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosídeo. A estaquiose ($\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_{21}$) é um tetrassacarídeo que contêm duas moléculas de galactose, uma de glicose e outra de frutose. Pode ser chamada de galactosil-rafinose, sendo conhecida também por lupeose, β -galactan, maneotreosa

e α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosídeo. Já a verbascose ($C_{30}H_{52}O_{26}$), é um pentassacarídeo constituído por três moléculas de galactose, uma de glicose e uma de frutose. Esta galactosil-estaquiose ou trigalactosil-sacarose pode ser denominada também de α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosídeo (SILVA *et al.*, 1992).

Os oligossacarídeos da Família Rafinose são sintetizados e armazenados em sementes e tubérculos, durante o processo de amadurecimento, permanecendo estáveis nos estágios iniciais da germinação (DEY, 1990). As proporções desses oligossacarídeos nas leguminosas variam de acordo com o grau de maturação da planta e de condições de cultivo como composição do solo e temperatura (SAKLA *et al.*, 1988).

Eles estão presentes em quantidades relativamente altas (2-15% de peso seco) em sementes de leguminosas (REDDY *et al.*, 1984). Nos grãos, a estaquiose é o oligossacarídeo mais encontrado, seguido pela rafinose e verbascose, sendo que, a distribuição desses açúcares varia de acordo com o grão (PETTERSON; MAKINTOSH, 1994). Hardinge, Swarner e Crooks (1965) analisaram o conteúdo de oligossacarídeos da Família Rafinose em grãos de leguminosas e verificaram que a soja teve o maior teor de rafinose (1,9%) e estaquiose (5,2%), e que o grão de bico e o feijão tiveram um maior teor de verbascose (4,2% e 4,1%, respectivamente). No entanto, quando Schweizer, Horman e Würsch (1978) analisaram grãos de diferentes origens o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) variedade Soissons foi o que apresentou o maior conteúdo em estaquiose (5,6%).

Rafinose e estaquiose são encontradas também no leite de soja, que pode utilizado como meio de crescimento para bifidobactérias; visto a capacidade de fermentação desses açúcares por bactérias desse gênero (WANG *et al.*, 2003). Alguns alimentos ricos em oligossacarídeos da Família Rafinose são lentilha, grão de bico, feijão, soja (CARLSSON; KARLSSON; SANDBERG, 1992) e amendoim (BASHA, 1992).

Oligossacarídeos da família rafinose, especialmente a rafinose e a estaquiose são considerados os maiores fatores de flatulência após a ingestão da soja ou outros legumes (DEY; PRIDHAM, 1972). Esses açúcares fazem parte do grupo de carboidratos dietéticos reconhecidos como oligossacarídeos não digeríveis (ONDs) (PLAYNE; CRITTENDEN, 1996). A ausência da enzima α -galactosidase,

responsável pela quebra das ligações galactosídicas α -1-6 no trato gastrointestinal, faz com que os oligossacarídeos se acumulem no intestino delgado e sejam fermentados por bactérias anaeróbias (SALUNKHE, 1982). A fermentação dos oligossacarídeos leva a produção de ácidos graxos de cadeia curta e gases como dióxido de carbono, hidrogênio e metano, que podem ocasionar diarreia osmótica e dor abdominal (CUMMINGS; ENGLYST; WIGGINS, 1986).

Dentre alguns efeitos negativos associados a ingestão de um alto conteúdo de rafinose estão a interferência na digestão de outros nutrientes, os efeitos osmóticos no intestino e a fermentação anaeróbica, resultando no aumento da produção de gás (VAN BARNEVELD, 1999). Foi relatado que 5 gramas de rafinose podem produzir 300 mL de gases no cólon humano (FLEMING, 1981). Nos estudos de Liying *et al.* (2003) foi observado um aumento nos casos de diarreia quando suínos foram alimentados com uma dieta suplementada com 2% de estaquiose purificada.

Os carboidratos dietéticos que passam pelo estômago e não são digeridos, são os principais responsáveis pelo crescimento bacteriano no cólon (CUMMINGS, 1983). Segundo Cummings e Macfarlane (1991) estima-se que cerca de 10 a 60 gramas por dia de carboidratos chegam ao cólon, sendo que, aproximadamente 2 a 8 gramas seriam correspondentes aos oligossacarídeos.

No entanto, uma hidrólise desses oligossacarídeos pode ocorrer pela atividade da α -galactosidase, invertase ou ambas. A α -galactosidase cliva a ligação α -1,6 liberando galactose e sacarose, enquanto a invertase hidrolisa a ligação α -1,2, produzindo melibiose e frutose (DEY; PRIDHAM, 1972).

2.2.2 Digestibilidade dos oligossacarídeos

A maior parte dos oligossacarídeos consumidos é hidrolisada no trato gastrointestinal superior (boca, faringe, esôfago e estômago) (FIGURA 5). Os monossacarídeos resultantes são transportados, através da via sanguínea, ao fígado e subseqüentemente, ao sistema circulatório. Entretanto, alguns oligossacarídeos resistem ao processo digestivo, chegando ao cólon assim como foram ingeridos. No ceco-cólon, a maioria dos oligossacarídeos não digeridos é hidrolisada a monômeros e pequenos oligômeros, os quais são posteriormente, metabolizados pelas bactérias anaeróbicas. Durante a fermentação, parte do

substrato é usado como energia o crescimento celular, sendo o restante convertido em gases (H_2 , CO_2 , CH_4) e ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato, butirato e L-lactato) (MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

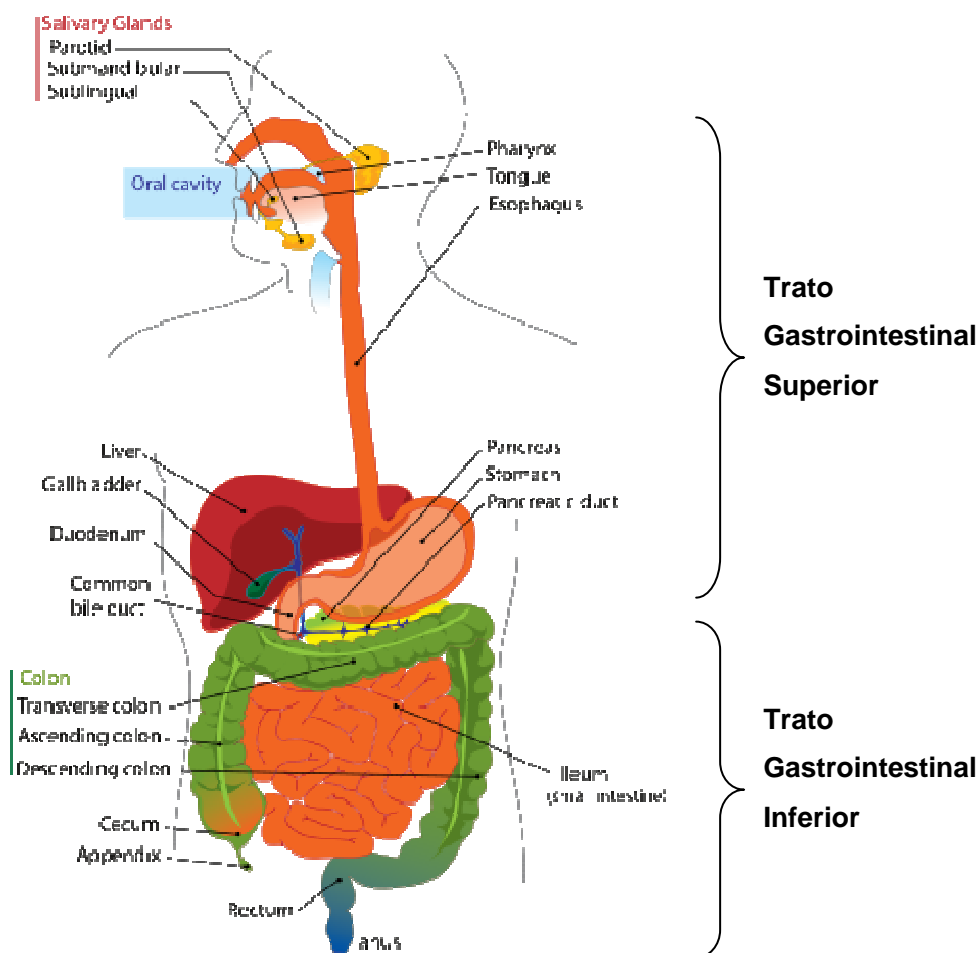


FIGURA 5 - TRATO GASTROINTESTINAL SUPERIOR E INFERIOR

FONTE: WIKIPEDIA (2008)

O cólon humano contém em torno de 10^{14} bactérias, as quais desempenham funções como a fermentação de resíduos alimentícios, modulação da imunidade intestinal e síntese de vitaminas (GIBSON; WANG, 1994). *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* estão entre os grupos de bactérias que colonizam o trato gastrointestinal e utilizam os oligossacarídeos como substrato (BIELECKA *et al.*, 2002). A TABELA 4 apresenta os microrganismos anaeróbios predominantes no cólon humano.

TABELA 4 – MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS PRESENTES NO CÓLON HUMANO

Grupo Microbiano	Faixa de contagem em log (g peso seco/ peso úmido)
<i>Bacteróides</i>	9,2-13,5
<i>Eubacterium</i>	5,0-13,3
<i>Bifidobacterium</i>	4,9-13,4
<i>Clostridium</i>	3,3-13,1
<i>Lactobacillus</i>	3,6-12,5
<i>Ruminococcus</i>	4,6-12,8
<i>Peptostreptococcus</i>	3,8-12,6
<i>Peptococcus</i>	5,1-12,9
<i>Streptococcus</i>	7,0-12,3
<i>Metanobrevibacter</i>	7,0-10,3
<i>Desulfovibrios</i>	5,2-10,9

FONTE: ADAPTADO DE MACFARLANE e GIBSON (1994)

A taxa com que os oligossacarídeos são fermentados depende do grau de polimerização, açúcar e ligações glicosídicas, grau de ramificação, sinergia com a bactéria durante a fermentação, relacionamento entre substrato-bactéria e produtos da fermentação, natureza da fermentação e capacidade sacarolítica (BIELECKA *et al.*, 2002).

O consumo excessivo de oligossacarídeos, no entanto, causa desconforto intestinal, flatulência e diarreia. Tais sintomas ocorrem devido a uma alta taxa de fermentação, e ocasionam desconfortos como a produção de gases e o efeito osmótico (transferência de água ao intestino grosso) (SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999).

Veldman *et al.* (1992) observaram que um alto nível de α -galactosídeos na dieta (27,5 g/kg) mostrou um significativo efeito adverso na digestibilidade ílea de nutrientes e auxiliou na produção do quimo em leitões. Estudos relataram que um consumo de galacto-oligossacarídeos maior que 20 gramas por dia causaram diarreia em humanos (SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999).

A fim de se minimizar as consequências indesejáveis causadas pela ingestão dos oligossacarídeos, várias alternativas vêm sendo empregadas. Dentre elas pode-se citar a extração aquosa ou alcoólica, mudanças no pH, umidade ou temperatura (CALLOWAY; HICKEY; MURPHY, 1971), maceração, cozimento,

germinação, tratamentos com irradiação gama e α -galactosidases microbianas ou de plantas (GUIMARÃES *et al.*, 2001; MACHAIAH; PEDNEKAR, 2002) e extrusão (BOREJSZO; KHAN, 1992). Van Barneveld (1999) mostrou que a extração dos oligossacarídeos de *Lupinus angustifolius* e *Lupinus albus* melhorou significativamente a digestão de todos os aminoácidos em suínos.

2.3 PRODUÇÃO DE GASES OU FLATULÊNCIA

A palavra flatulência deriva-se do latim *flatus* e é um fenômeno fisiológico que acontece pela ação de bactérias do cólon, que fermentam os substratos produzindo gases. Tal produção de gás se deve a degradação de hidratos de carbono não digeridos no intestino grosso, provenientes de oligossacarídeos de frutas e legumes, amido e fibras alimentares (PEYRIN-BIROULET; BIGARD, 2005). Segundo Levitt *et al.* (1987) esses substratos são a origem da maior parte das reações de fermentação que acontecem no cólon.

Os açúcares rafinose e estaquiose são os oligossacarídeos mais associados a produção de flatulência (DE LUMEN, 1992). No QUADRO 1 estão alguns alimentos responsáveis pelo fenômeno da flatulência.

Hidratos de carbono (glicídios)	Alimentos
Frutose	Trigo, cebola, pêra, refrigerante, frutas
Lactose	Leite, queijo, sorvete, molhos de salada, margarina
Rafinose	Legumes (feijão, ervilha), grãos inteiros, aspargo, couve
Sorbitol	Maçã, pêra, pêssego, ameixa, goma de mascar
Amido	Pão branco, massas, batata, milho
Fibras alimentares	Trigo, aveia, legumes, frutos secos (damascos, passas, ameixas), couve, cenoura, aspargo, brócolis, beterraba
Lipídios	Carnes gordas, molhos, queijos com mais de 25% de gordura, fritura, bacon, pastel
Alimentos aerados	Refrigerantes, soufflés, merengues

QUADRO 1 – PRINCIPAIS ALIMENTOS RESPONSÁVEIS PELA FLATULÊNCIA

FONTE: ADAPTADO DE PEYRIN-BIROULET e BIGARD (2005)

O gás metano e hidrogênio são os principais produtos do cólon e se difundem através do lúmen intestinal, sendo absorvidos. O gás carbônico é absorvido pela mucosa digestiva do duodeno e do cólon. Já os gases nitrogênio e oxigênio são absorvidos no estômago e difundem-se para o sangue devido a uma diferença de pressão de aproximadamente 60 mmHg. A difusão do nitrogênio do estômago para o sangue e do sangue para o intestino e cólon gera a produção excessiva de gases como H_2 , CH_4 e CO_2 (PEYRIN-BIROULET; BIGARD, 2005), como mostra a FIGURA 6.

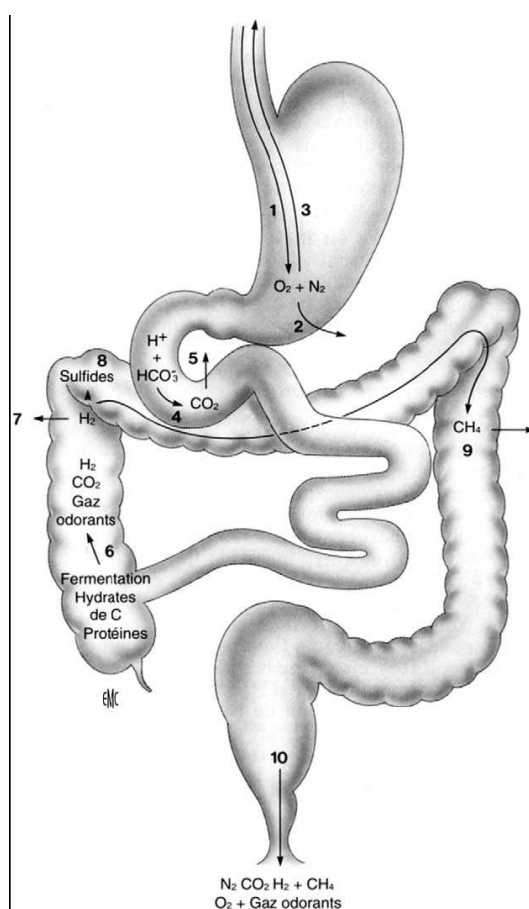


FIGURA 6 - MECANISMO DE PRODUÇÃO E CONSUMO DE GASES

FONTE: PEYRIN-BIROULET e BIGARD (2005)

O volume de gases produzidos no trato gastrointestinal é menor que 200 mL, sendo que, uma média de 600 a 700 mL são liberados diariamente após consumo de uma dieta padrão contendo 200 gramas de feijão cozido (TOMLIN; LOWIS; READ, 1991). Após as refeições, estima-se que os homens liberam gases 14 vezes

por dia. Os gases mais associados à flatulência são o nitrogênio, oxigênio, dióxido de carbono, hidrogênio e metano, sendo aqueles produzidos pela fermentação dos nutrientes e de glicoproteínas endógenas de bactérias colonizadoras – como o hidrogênio, metano e dióxido de carbono – responsáveis por 74% da flatulência (SUAREZ *et al.*, 1997). Os odores provenientes dos gases liberados podem ser correlacionados às concentrações de sulfeto de hidrogênio, ou outros gases contendo enxofre, como por exemplo, metanodiol e dimetil sulfeto (SUAREZ; SPRINGFIELD; LEVITT. 1998).

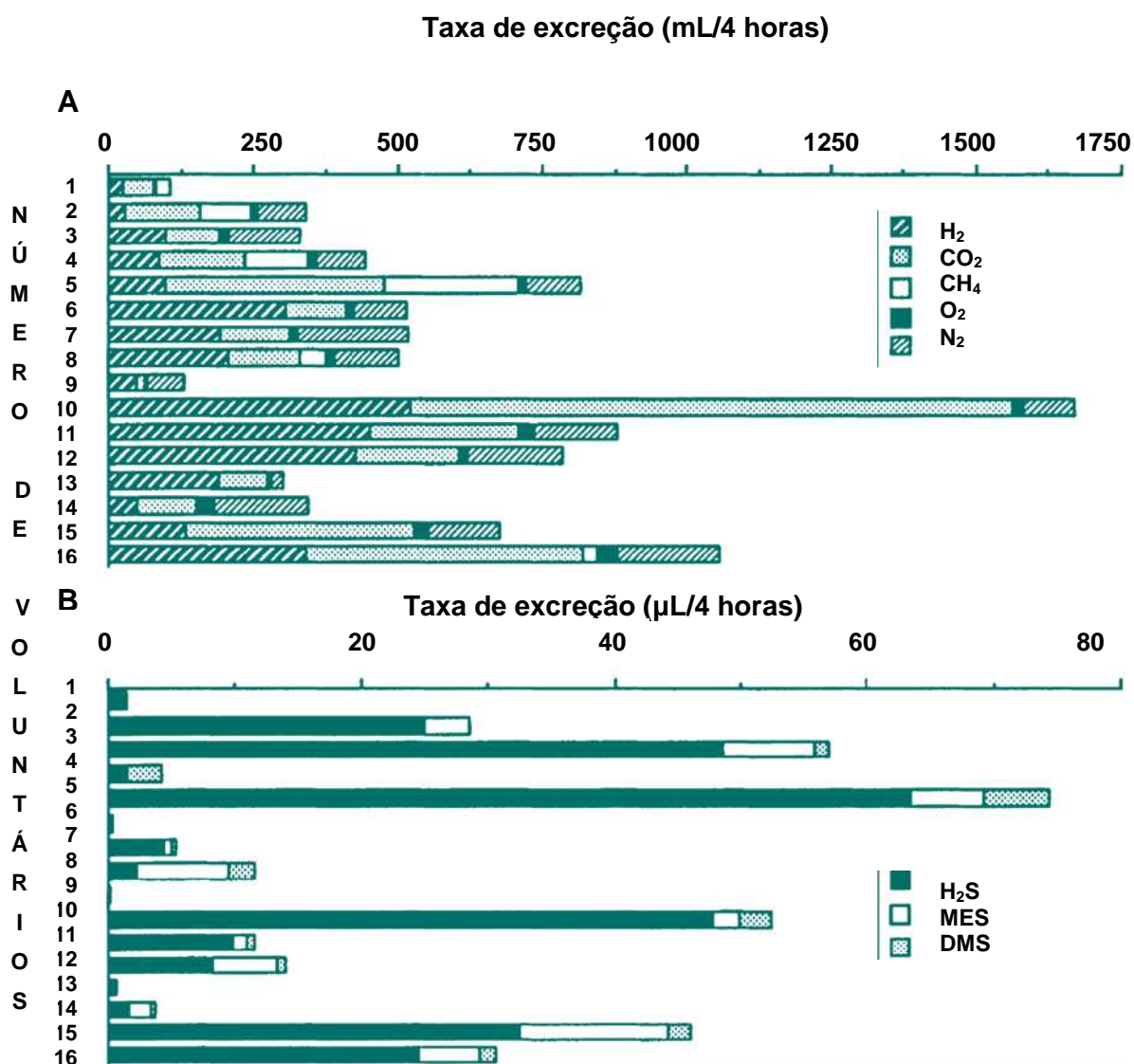


FIGURA 7 - VOLUME DE GASES PRODUZIDOS POR 16 VOLUNTÁRIOS DURANTE 4 HORAS

FONTE: SUAREZ *et al.* (1997)

A FIGURA 7 mostra o volume de gases que passaram pelo reto de 16 voluntários saudáveis por um período de 4 horas. Os gases encontrados em maior quantidade foram o hidrogênio (H_2), dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), oxigênio (O_2) e nitrogênio (N_2) (A). Gases contendo enxofre apresentam-se em menor quantidade como sulfato de hidrogênio (H_2S), metanodiol (MES) e dimetil sulfeto (DMS) (B) (SUAREZ *et al.*, 1997).

Nos estudos de Tomlin, Lowis e Read (1991) 10 pacientes saudáveis foram avaliados quanto a manifestação da flatulência. Quando à dieta normal foram acrescentados 200 gramas de feijão cozido, esses indivíduos produziram um volume diário de gases entre 476 mL e 1491 mL (mediana = 705 mL). A coleta dos gases foi realizada através de um tubo de borracha impermeável, conectado ao ânus dos voluntários, o qual continha na outra extremidade uma “bolsa” laminada impermeável a difusão de gases, que recebia os gases periodicamente após a digestão. O monitoramento da produção de gases foi feito durante 24 horas.

Além da eliminação de gases via retal, a manifestação da flatulência pode ser na forma de náuseas, aumento do peristaltismo, sensação de distensão abdominal associada a dor, câimbras espasmódicas, desconforto social (CALLOWAY, 1968), dispepsia, constipação e diarreia (PATWARDHAN; WHITE, 1973).

2.4 PRODUTOS OBTIDOS POR PROCESSOS FERMENTATIVOS

A importância da fermentação como processo industrial é crescente, tal que mais de 300 empresas por todo o mundo produzem e comercializam produtos obtidos através de processos fermentativos. A produção em larga escala teve origem na primeira guerra mundial com a produção de glicerol (processo microbiológico) para a fabricação de explosivos (VILLEN, 2006). Existem mais de 100 produtos obtidos através da via fermentativa. Alguns exemplos são mostrados no QUADRO 2.

Bioprodutos	Exemplos
Enzimas	proteases, glucoamilase, α -amilase, glicose isomerase
Ácidos Orgânicos	ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico
Aminoácidos	ácido glutâmico, ácido aspártico, triptofano
Vitaminas	vitaminas do complexo B, notadamente a B2
Biopolímeros	goma xantana, dextranas
Solventes	etanol, butanol, acetona
Bebidas Alcoólicas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ fermentadas: cerveja, vinho saquê, sidra, etc ▪ fermento-destiladas: aguardente, rum, uísque, conhaque, vodca, gim
Microorganismos	produção de levedura para panificação e <i>single cell protein</i> (SCP) para a nutrição animal
Alimentos	queijos, iogurte, pickles, azeitonas, pão, chucrute

QUADRO 2 – PRODUTOS OBTIDOS POR VIA FERMENTATIVA

FONTE: VILLEN (2006)

2.4.1 Fermentação de alimentos

Os microrganismos responsáveis pelas fermentações de alimentos podem ser denominados proteolíticos, lipolíticos ou fermentativos, de acordo com o seu conteúdo enzimático. No entanto, a maioria dos microrganismos exibe essas três propriedades, de acordo com as condições ambientais e outros fatores, não podendo ser considerados exclusivamente proteolíticos, lipolítico ou fermentativo (POTTER, 1973).

O mesmo autor afirma que os alimentos fermentados são mais nutritivos que os não fermentados. Isso é justificado por uma melhora na digestibilidade de alguns alimentos; pois durante o processo, ocorre a quebra enzimática da celulose, hemicelulose e outros polímeros que não podem ser digeridos pelo homem. Outro benefício trazido pela fermentação é a produção de ácidos e álcoois (produtos finais) que acabam inibindo organismos patógenos comuns.

O aroma dos alimentos fermentados é atribuído, em grande parte, a componentes químicos voláteis (por exemplo: aminas, ácidos graxos, aldeídos e cetonas) e produtos derivados da interação entre estes componentes durante a fermentação e maturação (FELLOWS, 1994).

2.5 FERMENTAÇÃO LÁCTICA

A fermentação láctica ocorre pela ação enzimática das bactérias lácticas sobre açúcares simples (hexoses) convertendo-os a ácido láctico (FERREIRA, 1987). As bactérias lácticas são capazes de produzir diferentes isômeros do ácido láctico mediante a fermentação da glicose, podendo este ser D(+) dextrorotatório ou L(-) levorotatório ou uma mistura de ambos (DL) (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

2.5.1 Ácido láctico

Ácido láctico é nome popularmente conhecido do ácido 2-hidroxipropanóico ($C_3H_6O_3$), ocorrendo largamente na natureza como ácido carboxílico (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004). A molécula de ácido láctico possui um carbono assimétrico, que possibilita a obtenção de dois isômeros opticamente ativos (D e L).

Industrialmente, o ácido láctico é produzido por síntese química ou fermentação. A síntese química sempre produz misturas racêmicas D/L, enquanto que, por via fermentativa são obtidos isômeros puros (D ou L), quando se utilizam os microrganismos apropriados. O ácido L-láctico é o comumente utilizado, sendo reconhecido como seguro pela Food and Drug Administration (FDA), e pode ser usado como aditivo alimentar (WEE; KIM; RYU, 2006).

2.5.2 Bactérias ácido lácticas (BAL)

As bactérias ácido lácticas são microrganismos sem motilidade, não esporulados, Gram-positivos, catalase negativos, anaeróbios aerotolerantes (BORZANI *et al.*, 2001). Constituem-se de células vivas procariontes e são heterotróficas, necessitando de fontes de carbono relativamente complexas (DELLAGLIO *et al.*, 1994). A obtenção da energia se dá pela fermentação de carboidratos, produzindo o ácido láctico como maior produto de fermentação (MASSAGUER, 2005).

As BAL estão associadas ao mais variados habitats, especialmente aqueles ricos em nutrientes como substratos alimentícios ou plantas. Podem também ser encontradas em solo, água, esterco, resíduos de esgoto e silagem. Algumas cepas

habitam a cavidade oral humana, o trato intestinal e a vagina, podendo influenciar benéficamente estes ecossistemas humanos (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

O grupo das bactérias ácido lácticas é constituído por 12 gêneros de bactérias Gram-positivas que são: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (JAY, 2005). O gênero *Bifidobacterium* é freqüentemente considerado do grupo de bactérias lácticas por apresentar características comuns como o metabolismo fermentativo e a produção de ácido láctico, apesar de não ser filogeneticamente relatado (WESSELS *et al.*, 2004).

Morfológicamente, as bactérias lácticas podem estar distribuídas em cocos medindo entre 0,5 e 2 μm (exemplos: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Tetragenococcus*), ou bastões regulares que têm diâmetro variável entre 0,5 e 2 μm e comprimento maior que 10 μm (exemplos: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) (ROISSART; LUQUET, 1994).

No que diz respeito às necessidades para o crescimento, as bactérias lácticas precisam de aminoácidos, vitamina B e bases púricas e pirimídicas. Embora a maioria delas seja mesofílica, algumas podem crescer em temperaturas abaixo de 5°C e outras acima de 45°C. Com relação ao pH, a maioria cresce entre 4,0 e 4,5; porém algumas são capazes de crescer abaixo de pH 3,2 e outras acima de pH 9,6 (STAMER, 1976).

A classificação das bactérias lácticas dentre os diferentes gêneros é baseada na morfologia, mecanismos de fermentação da glicose, diferentes temperaturas de crescimento, configuração do ácido láctico produzido, habilidade de crescer em altas ou baixas concentrações de sais e características como tolerância ao pH. Outro fator de classificação leva em consideração características fisiológicas e bioquímicas, as quais permitem o seu uso industrial. Entre elas estão a quantidade de ácido láctico produzido, temperaturas ótimas de crescimento, tolerância ao oxigênio e a diferentes concentrações de cloreto de sódio, capacidade de produzir gás, compostos aromáticos e voláteis, sensibilidade a antibióticos e produção de bacteriocinas ou capacidade inibitória frente aos patógenos (SIMPSON; TAGUCHI, 1995).

Com relação aos produtos finais de metabolismo da glicose as bactérias ácido lácticas podem ser classificadas em **homofermentativas** e **heterofermentativas**. Aquelas que produzem o ácido láctico como único ou principal

produto de fermentação da glicose são chamadas de **homofermentativas**. Já, as que produzem a mesma quantidade molar de lactato, dióxido de carbono e etanol a partir das hexoses são denominadas **heterofermentativas**. Bactérias **homofermentativas** possuem as enzimas aldolase e hexose isomerase e utilizam a via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para produzir duas moléculas de lactato para cada molécula de glicose. As bactérias **heterofermentativas**, no entanto, possuem a enzima fosfoacetolase e utilizam a rota das hexoses monofosfatos ou das pentoses (JAY, 2005). As vias metabólicas usadas pelas BAL na fermentação da glicose são mostradas na FIGURA 8.

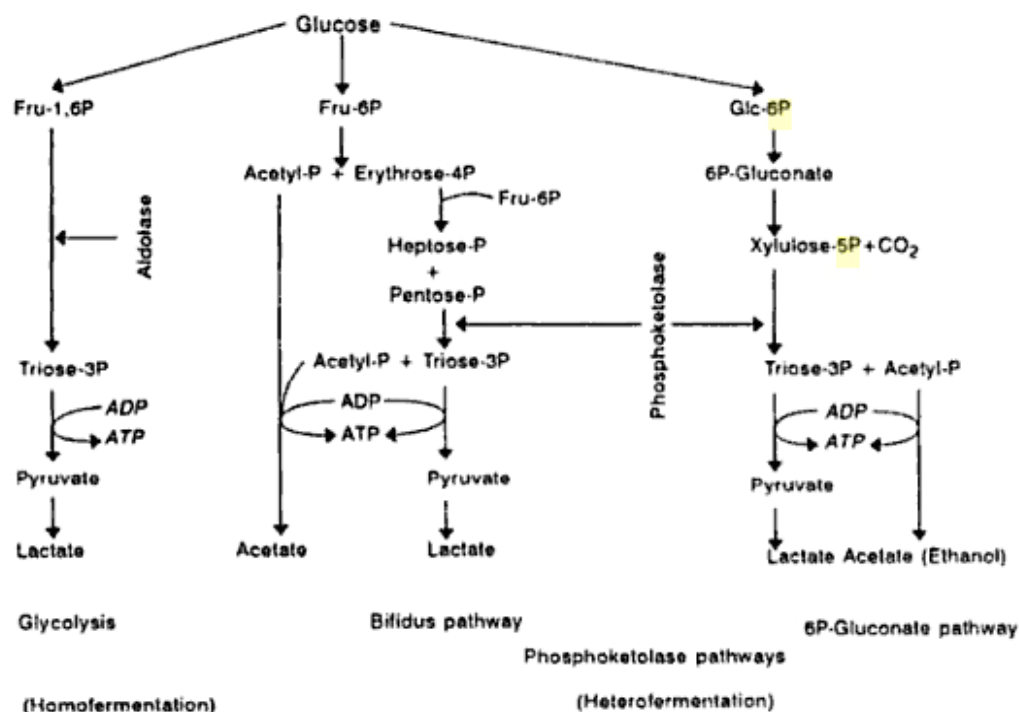


FIGURA 8 – VIAS METABÓLICAS DE FERMENTAÇÃO DA GLICOSE (HEXOSE) POR BACTÉRIAS LÁCTICAS

FONTE: KANDLER (1983)

Entre as principais bactérias responsáveis pela fermentação láctica estão o *Bacillus dextralacticus*, *Bacillus mesentericus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia intermedium*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbruechii*, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus leishmanii*, *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroideus* (EVANGELISTA, 2005).

2.5.2.1 Ação probiótica das BAL

O termo “probiótico” refere-se a microrganismos viáveis que promovem, ou ajudam beneficemente no balanço da população microbiana do trato gastrointestinal (HOLZAPFEL *et al.*, 2001). As BAL são as maiores representantes do grupo de probióticos tanto no mercado alimentício como no farmacêutico (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). Na TABELA 5 estão algumas espécies de BAL que podem ser aplicadas em produtos probióticos.

TABELA 5 – BACTÉRIAS LÁCTICAS USADAS NA ELABORAÇÃO DE PRODUTOS PROBIOTICOS

Espécies <i>Lactobacillus</i>	Espécies <i>Bifidobacterium</i>	Outras espécies
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> *
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus Faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> *
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	
<i>L. gallinarum</i> *	<i>B. infantis</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>	
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

FONTE: ADAPTADO DE HOLZAPFEL e SCHILLINGER (2002)

*NOTA: Empregado principalmente em animais.

Os benefícios do uso de cepas probióticas foram demonstrados pelo *Lactobacillus casei* da espécie “Shirota” (SHIROTA; ASO; IWABUCHI, 1966). Outras cepas também vêm sendo extensivamente estudadas quanto às suas propriedades funcionais como o *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *L. johnsonii* (SALMINEN *et al.*, 1998; REID *et al.*, 2003).

Segundo Holzapfel *et al.* (1998) algumas propriedades funcionais das bactérias probióticas são a produção de vitaminas, disponibilidade de minerais e elementos traços, produção de enzimas digestivas, efeito protetor contra diversos tipos de diarreias, diminuição do colesterol, estimulação do sistema imune, auxílio na

motilidade do intestino, prevenindo a constipação, aderência e colonização resistente, e manutenção da integridade da mucosa intestinal.

O uso dos probióticos tem se expandido e diversas são as indicações para o seu consumo, como por exemplo, o uso no caso de inflamações intestinais, para normalizar disfunções da mucosa intestinal e diminuição da hipersensibilidade (ISOLAURI *et al.*, 2001). Estudos de Schiffrin *et al.* (1995) associaram a aderência de cepas probióticas no trato gastrointestinal a um aumento nos níveis do IgA do soro.

2.5.2.2 *Lactobacillus agilis*

O *Lactobacillus agilis* faz parte do grupo *Lactobacillus casei* – *Pediococcus* (FIGURA 9). Segundo a classificação de Schleifer e Ludwig (1995) bactérias pertencentes a este grupo possuem metabolismo heterofermentativo facultativo.

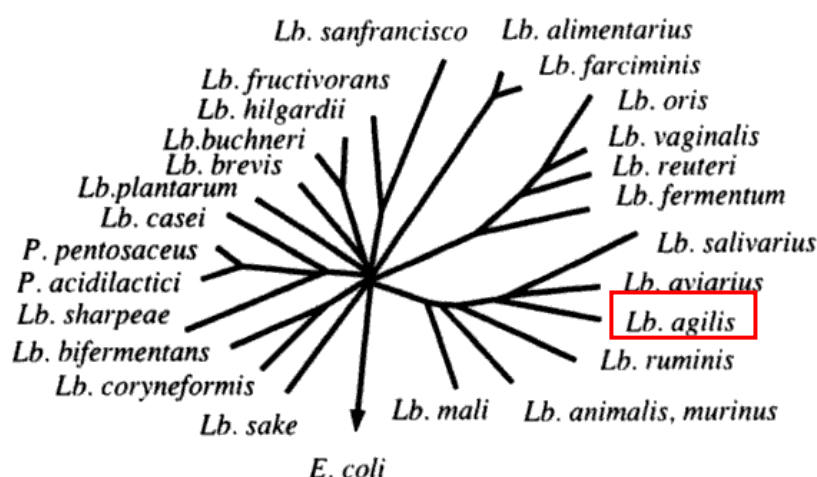


FIGURA 9 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GRUPO *Lactobacillus casei*-*Pediococcus*.

FONTE: SCHLEIFER e LUDWIG (1995)

Na literatura há poucos relatos sobre as características e o comportamento do *Lactobacillus agilis*. Baele, Devriese e Haesebrouck (2001) estudando a microflora de pombos constataram a predominância da bactéria *L. agilis*, dentro os quais, 50% foram capazes de fermentar o açúcar rafinose. Segundo esses autores, a origem desse grupo de bactérias pode ter sido de esgoto municipal, de acordo com a descrição original dessas espécies (WEISS *et al.*, 1981).

Johansson *et al.* (1993) avaliaram a administração de 19 cepas endógenas de *Lactobacillus* através da ingestão de sopa de farinha de aveia por voluntários saudáveis durante 10 dias. Eles constataram um aumento da população bacteriana e a manutenção desse número ao final da administração. Entre os efeitos observados em alguns voluntários eles encontraram uma diminuição do número de *Clostridium* sulfito redutor no jejuno (intestino) e de bactérias anaeróbicas Gram-negativas no reto. As bactérias reisoladas da mucosa após a administração foram o *Lactobacillus plantarum* 299 e 299v, *Lactobacillus casei* subsp. *rharnosus* 271, *Lactobacillus reuteri* 108 e *Lactobacillus agilis* 294.

Souza *et al.* (2007) investigaram a composição em BAL no ceco de aves *Gallus gallus domesticus* com criação intensiva (confinada) e extensiva (livres) e verificaram a presença de cepas de *Lactobacillus agilis* somente em aves de criação extensiva.

2.6 ENZIMA A-GALACTOSIDASE

A enzima α -D-galactosídeo galactohidrolase (E.C.3.2.1.22), mais conhecida como α -galactosidase está bem distribuída em microrganismos (DE REZENDE; FELIX, 1999), plantas e animais (DEY; PRIDHAM, 1972). De um modo geral, ela é capaz de hidrolisar uma variedade tanto de α -D-galactosídeos simples como moléculas mais complexas, como oligossacarídeos e polissacarídeos (GUIMARÃES *et al.*, 2001). Trata-se de uma exoglicosidase que quebra ligações α -1,6 de resíduos de galactosil em galacto-oligossacarídeos e galactomananas (FUJIMOTO *et al.*, 2003).

A α -galactosidase tem diferentes formas, podendo ser monomérica ou tetramérica, com termo estabilidade e conformação diretamente relacionadas (ALANI; SMITH; MARKAKIS, 1989). Para Manzanares, Graaff e Visser (1998) α -galactosidases de origem bacteriana apresentam vantagens sobre as enzimas de origem fúngica devido a sua maior produção.

Esta enzima apresenta diferentes funções nas plantas, e está presente em todos os tecidos que contém α -galactosídeos (ALANI; SMITH; MARKAKIS, 1989). Para Dopico, Nicolas e Labrador (1989) a α -galactosidase tem participação no crescimento das plantas, já que, reações enzimáticas que ocorrem na parede celular acabam promovendo a hidrólise de glucanos e a quebra de ligações dos seus

polissacarídeos, estando a α -galactosidase envolvida nesse processo. Além disso, ela atua no reconhecimento celular, no transporte de açúcares e como glicoproteína na organização de sistemas multi-enzimáticos. Tal enzima tem também ação antibiótica contra as bactérias do solo, protegendo a planta contra substâncias α -galactosídicas fitotóxicas produzidas por microrganismos invasores, como por exemplo, *Didymella applanata*, que causa infecções em framboeseiras (PORTER *et al.*, 1992).

2.6.1 Produção da α -galactosidase por BAL

Bactérias lácticas como *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri* e *L. reuteri*) são capazes de hidrolisar os α -galactooligossacarídeos em fermentações vegetais devido a atividade da α -galactosidase (LeBLANC *et al.*, 2005).

Estudos relatam a produção de variados níveis da α -galactosidase por cepas do gênero *Bifidobacterium*, a qual metaboliza os oligossacarídeos α -galactosil em leite de soja (SCALABRINI *et al.*, 1998). Nos estudos realizados por DONKOR *et al.* (2007) o *Lactobacillus acidophilus* (La4962 e L10), *Bifidobacterium lactis* B94 e *Bifidobacterium longum* BI536, *Lactobacillus casei* Lc279 e *Lactobacillus casei* L26, *Streptococcus thermophilus* St1342 e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Lb1466 exibiram variáveis atividades da α -galactosidase. A redução da rafinose em leite de soja foi de 77,4%, 64,5% e 55,9% utilizando *B. lactis* B94, *S. thermophilus* St1342 e *L. acidophilus* La4962, respectivamente.

LeBlanc *et al.* (2004 e 2005) desenvolveram duas estratégias para remover os oligossacarídeos em leite de soja. Eles verificaram que o *L. fermentum* CRL 722 teve alto nível de produção da α -galactosidase quando cultivado em leite de soja. A mesma cepa foi usada então num estudo posterior como veículo para liberar a α -galactosidase no intestino delgado de roedores. Como resultados, eles concluíram que houve uma significância estatística, no estômago e duodeno, quando os ratos foram alimentados com *L. fermentum* CRL 722 ou extratos livres de células em relação ao grupo controle.

2.6.2 Aplicação tecnológica da α -galactosidase

A α -galactosidase tem aplicação tecnológica na produção de açúcar de beterraba, sendo utilizada para remover a rafinose do melaço de beterraba e aumentar o rendimento da sacarose (SHIBUYA *et al.*, 1995). Além disso, ela pode ser usada para melhorar as propriedades geleificantes de galactomananas utilizadas como espessantes (BULPIN; GIDLEY; JEFFCOAT, 1990) e para degradar açúcares da Família Rafinose em produtos como o farelo de soja ou leite de soja (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

Gdala *et al.* (1997) avaliaram a suplementação da enzima α -galactosidase em dietas a base de sementes de tremoços (*Lupinus luteus* e *Lupinus angustifolius*) usadas na alimentação de suínos. Esses autores constataram uma redução de 80% dos α -galactosídeos de *Lupinus luteus* cv Juno no intestino delgado de suínos alimentados com a enzima. O emprego da α -galactosidase aumentou significativamente a digestibilidade da rafinose, estaquiose e verbascose em valores acima de 97%.

Contudo, é importante considerar, que a atividade da α -galactosidase pode ser inibida ou reduzida por vários componentes presentes no trato digestivo, como as enzimas digestivas e os sais biliares, que podem afetar também a sobrevivência das cepas produtoras dessa enzima (LeBLANC *et al.*, 2005).

Alguns estudos têm sido realizados com a aplicação direta da α -galactosidase em leguminosas, a fim de degradar os açúcares da família rafinose, presentes nesses alimentos (THIPPESWAMY; MULIMANI, 2002).

2.7 DESIDRATAÇÃO DE ALIMENTOS

A desidratação de alimentos é um método de secagem, que se baseia na extração da água por aquecimento, evaporação e sublimação, sob condições controladas (EVANGELISTA, 2005). Constitui-se em um dos métodos mais antigos de conservação, que consiste na redução da água dos alimentos, com elevação da pressão osmótica do meio, dificultando, dessa forma, a proliferação de microrganismos contaminantes.

No processo de secagem dos alimentos ocorrem simultaneamente transferência de calor e de massa. A transferência de massa consiste no movimento

da água ou do vapor d'água através do alimento e arraste do vapor d'água do alimento para o ambiente (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

De acordo com o autor citado anteriormente os principais objetivos da secagem na indústria alimentícia são:

- Conservação dos alimentos - a redução da atividade de água (a_w) favorece a inibição do crescimento de microrganismos, da atividade de algumas enzimas e de determinadas reações químicas.
- Reduzir o peso e volume dos alimentos, reduzindo os custos de transporte e armazenamento.
- Facilitar o uso e diversificar a oferta dos produtos.

De acordo com Jay (2005) para a secagem de vegetais são recomendadas temperaturas de 60°C a 62,7°C, sendo que o teor de umidade deve ser reduzido a 4%, para que o prazo de estocagem e a qualidade do produto sejam satisfatórios. Industrialmente, a secagem pode ser feita em secadores de túnel, esteira ou tipo gabinete.

Alguns produtos desidratados disponíveis no mercado são o leite em pó, frutas secas, café em pó, preparações para purês e sopas, ovo em pó, massas alimentícias e outros (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Alguns exemplos são apresentados na TABELA 6.

TABELA 6 – TEOR DE ÁGUA DE ALGUNS ALIMENTOS DESIDRATADOS

Alimentos	% de Água
Leite em pó integral	~ 8
Ovos desidratados	10 – 11
Farinha de trigo	13 – 15
Arroz	13 – 15
Carne hidratada sem gordura	15
Brotos	15
Vegetais desidratados	14 – 20
Amido	18
Frutas desidratadas	18 – 25

FONTE: MOSSEL e INGRAM (1955)

NOTA: UR = 70%; temperatura = 20°C

O comportamento dos alimentos durante a desidratação é muito variado. Um alto conteúdo de água no início acelera a velocidade inicial de secagem. Alimentos com porcentagem elevada de amido, por exemplo, têm maior quantidade de água ligada, e apresentam velocidade constante de secagem (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Segundo Ordóñez *et al.* (2005) o processo de secagem pode ocorrer em velocidades diferentes, dependendo das características do alimento e das condições de processamento, podendo também ocasionar mudanças, como:

- Endurecimento superficial – ocorre quando a secagem inicial é muito rápida. O vapor d'água é eliminado muito mais rapidamente da superfície do produto do que do centro. Pode resultar em uma forte retração da camada superficial, com formação de uma película dura e impermeável, a qual oferece forte resistência à transferência de vapor posterior. Em alguns, há formação de crosta (*case hardening*) que se deve à concentração de açúcares em estado vítreo. O endurecimento superficial pode ocorrer também em função altas temperaturas atingidas nas camadas externas ao final da dessecação, as quais podem induzir a mudanças físicas e químicas complexas.
- Movimento de sólidos solúveis – ocorre geralmente quando a secagem inicial é lenta. As substâncias hidrossolúveis (sais e açúcares) são arrastadas pela água do centro até a superfície do alimento, estas se concentram e podem cristalizar ou formar uma camada amorfa de aspecto pegajoso e impermeável, a qual dificulta a saída do vapor d'água. Como consequência, esses compostos solúveis se depositam na superfície do produto, podendo ou não migrar para o interior do alimento (efeito osmótico), dependendo das características do produto e condições de secagem.
- Retração – consiste na redução do volume inicial, sendo mais acentuada, quando a desidratação é lenta.

Outras alterações que também podem ocorrer durante esse processo, sobretudo quando a temperatura é elevada, são a gelatinização do amido, com formação de uma camada superficial impermeável, escurecimento não enzimático, perda de substâncias aromáticas voláteis, diminuição da capacidade de retenção de água, que pode ser decorrente da desnaturação e agregação de proteínas, mudanças na textura, perda de nutrientes e mudanças na coloração (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

2.7.1 Métodos de desidratação

A escolha do método de secagem depende das características físicas (viscosidade, tamanho dos sólidos) e químicas (sensibilidade térmica, predisposição a oxidação). No QUADRO 3 encontram-se alguns métodos de secagem utilizados na indústria alimentícia.

Método	Transferência de calor	Equipamento
Desidratação com ar quente	Convecção	1) Secador de duas plantas 2) Secador de cabine, bandejas ou compartimentos 3) Secador de tremonha 4) Secador de túnel 5) Secador rotatório 6) Secador transportador 7) Secador de base fluidizada 8) Secador pneumático 9) Secador atomizador
Desidratação por contato direto	Condução	1) Secador de tambor ou de rolo (único, duplo, gêmeos, a vácuo) 2) Secador a vácuo de placas 3) Secador a vácuo de esteira rolante
Desidratação por energia eletromagnética	Radiação, energia microondas ou aquecimento dielétrico	1) Secador infravermelho contínuo 2) Secador com microondas 3) Secador com aquecimento dielétrico

QUADRO 3 – MÉTODOS DE DESIDRATAÇÃO EMPREGADOS NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

FONTE: ADAPTADO DE ORDÓÑEZ *et al.* (2005)

2.7.1.1 Secagem por condução

Nesse tipo de secagem o calor é conduzido através de uma superfície quente. A eficácia térmica é maior se comparado a secagem com ar quente, visto que não necessita do aquecimento de um grande volume de ar. Quando a secagem é realizada sob pressão atmosférica, e a difusão do líquido do interior para a superfície diminui, a temperatura pode alcançar valores até 100°C. Para alimentos mais susceptíveis ao calor a operação pode ser feita sob pressão reduzida, onde as

temperaturas empregadas são mais baixas e o oxigênio pode ser excluído (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

A fim de evitar o aquecimento excessivo do produto é necessário que este esteja na forma de partículas finas. Também a transmissão de calor pode ser dificultada pela contração do produto (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

2.7.1.1.1 Secadores a vácuo

Esses tipos de secadores funcionam a vácuo e por transferência de calor feita através de condução ou radiação. As temperaturas utilizadas nesse sistema são mais baixas que no sistema do que não utiliza o vácuo. A retirada dos gases da câmara produz o vácuo. O vapor de água produzido se condensa e é retirado por meio de uma bomba. No entanto, o uso desse tipo de secador é restrito na indústria de alimentos devido ao seu custo elevado (EVANGELISTA, 2005).

2.8 RECONSTITUIÇÃO DOS ALIMENTOS DESIDRATADOS

A reconstituição ou reidratação de um alimento refere-se à sua capacidade de absorver água, retornando ao estado físico do produto original. O uso da água quente ou adição de agentes umectantes, que diminuam a tensão superficial, podem facilitar a reidratação (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Nos alimentos desidratados em forma de pó a reconstituição depende de algumas propriedades como a umectabilidade (capacidade das partículas adsorverem a água em sua superfície), que é influenciada pelo tamanho e composição das partículas; submergibilidade (capacidade das partículas imergirem rapidamente na água), que depende do tamanho e densidade das partículas; dispersibilidade (facilidade com que as partículas se distribuem), que evita a formação de grumos; e a solubilidade (velocidade e grau de dissolução das partículas na água), que depende da composição química e propriedades físicas do produto (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

3.1.1 Meios de cultivo e reagentes analíticos

O feijão usado foi o *Phaseolus vulgaris* L. variedade preto, marca Alimentos Zaeli Ltda.

Caldo MRS (Himedia)

Agar bacteriológico (Himedia)

Carbonato de cálcio P.A. (Synth)

Ácido sulfúrico 95-97% P.A. (Merck)

Ácido Clorídrico (Alphatec)

Hidróxido de sódio (Vetec)

Acetato de sódio (Synth)

p-nitrofenil- α -D-galatopiranosídeo (pNPGal) (Sigma-Aldrich)

Carbonato de sódio (Synth)

Éter de petróleo (Synth)

Sulfato de cobre (Reagen)

Sulfato de potássio (Synth)

3.1.2 Padrões HPLC

Ácido L-láctico 85.0% P.A. (Synth)

Estaquiase tetrahidratada, 98.5% (Aldrich)

D(+)-rafinose pentahidratada, 99+% (Acros Organics)

D(+)-glicose anidra (Acros Organics)

D(+)-frutose anidra (Vetec)

D(+)-galactose (Acros Organics)

3.1.3 Equipamentos

Balança semi-analítica MARTE modelo AL 500

Balança analítica SCIENTECH SA 120

Câmara de fluxo laminar VECO®

Autoclave vertical PHOENIX modelo AV 75

Microscópio óptico OLYMPUS COVER 018

Estufa de cultivo FANEM®

Liquidificador WALITA modelo LIQ FAZ

Espectrofotômetro SPECTRUMLAB 22 PC

Shakers NOVA TÉCNICA e TECNAL

Biorreator MDL - B.E.Marubishi capacidade 8L

Potenciômetro HANNA INSTRUMENTS modelo HI 9321

Centrífuga SORVALL® Legend TM Mach 1.6R

Centrífuga JOUAN A14

Estufa a vácuo VACUCELL 22,55 1M

Cromatógrafo SHIMADZU modelo LC-10 AC

Banho-maria NOVA TÉCNICA

Balança determinadora de umidade por infravermelho TOP RAY

Medidor de atividade água AQUALAB CX-2

Aparelho MACRO-KJELDAHL PRODICIL

Extrator Soxhlet PRODICIL

Mufla QUIMIS

Chapa elétrica TECNAL

Viscosímetro BROOKFIELD DV-II + PRO

3.2 MICRORGANISMOS

As bactérias lácticas estudadas foram provenientes do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná. Duas cepas utilizadas pertenciam ao estoque padrão do laboratório e as outras cepas foram previamente isoladas de amostras de colostro e fezes de origem bovina; intestino, ovos, bolsa e bile de peixe; e caldo de feijão cozido.

3.2.1 Isolamento e caracterização

O isolamento das culturas escolhidas para o presente estudo foi feito em meio seletivo MRS (DE MAN, ROGOSA e SHARPE, 1960) com 1,5% de ágar, contendo 0,3% do corante azul de anilina. De acordo com GIRAUD (1992) o azul de anilina em meio MRS auxilia no reconhecimento das cepas de bactérias lácticas, visto que elas têm a propriedade de assimilar o azul de anilina do meio, além de facilitar o reconhecimento das características morfológicas das colônias. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas até o aparecimento de colônias azuis com características morfológicas típicas de bactérias lácticas.

A caracterização das colônias isoladas foi feita mediante a observação da morfologia em microscópio óptico, pela técnica de coloração de Gram (MARTINS *et al.*, 1997), determinação de atividade da catalase e prova de produção de gás (HARRIGAN; MCCANCE, 1976), e análise da produção de ácidos orgânicos por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

Para a coloração de Gram, pegou-se uma colônia isolada em meio MRS ágar e realizou-se um esfregaço em lâmina de vidro, fixando-o em chama. O esfregaço foi coberto com solução violeta-de-metila, deixando-se agir por aproximadamente 15 segundos. Adicionou-se a mesma quantidade de água na lâmina e deixou-se por mais 45 segundos. Escorreu-se o corante e lavou-se em água corrente. Adicionou-se o lugol e deixou-se agir por aproximadamente 1 minuto. Escorreu-se o lugol e lavou-se em água corrente. Adicionou-se álcool etílico (99,5%) sobre a lâmina até que não houvesse mais desprendimento do corante. Lavou-se com água corrente. Adicionou-se safranina e deixou-se agir por aproximadamente 30 segundos, lavando-se posteriormente em água corrente. Deixou-se secando a temperatura ambiente ($\pm 15^{\circ}\text{C}$) e visualizou-se em microscópio óptico OLYMPUS COVER 018, utilizando o óleo de imersão para a visualização em objetiva de 100X.

Para determinar a atividade da catalase, pegou-se uma colônia isolada e colocou-se em contato com o peróxido de hidrogênio, observando após aproximadamente 2 minutos a formação de bolhas. A presença de bolhas indica uma reação positiva a atividade da enzima catalase, já na ausência de bolhas a reação é negativa.

O teste de produção de gás foi feito com o uso de tubos de Durhan invertidos e imersos em tubos com caldo MRS estéril. Inocularam-se culturas

crecidas a 37°C por 24 horas, sem agitação. Incubou-se a 37°C e observou a formação de bolhas às 24 e 48 horas. A presença de bolhas é positiva para a produção de gás a partir da glicose.

Para a análise por HPLC cultivos crescidos em caldo MRS a 37°C por 24 horas foram centrifugados a 5.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi diluído 1:10 e filtrado em membrana (Millipore) de diâmetro 0,22 µm. O cromatógrafo usado foi da marca SHIMADZU, coluna Aminex HPX 87H da BIO-RAD, fase móvel H₂SO₄ 5mM, vazão 0,6 mL/min, 60°C, volume de injeção 20 µL, detector Índice de refração.

3.2.2 Manutenção das cepas

As cepas foram conservadas em meio MRS com 10% de glicerol a temperatura de -20°C. A reativação foi feita pela inoculação de colônias puras em caldo MRS e incubação a 37°C por 24 horas, sem agitação.

3.2.3 Seleção e identificação das cepas

As bactérias caracterizadas como lácticas foram cultivadas em caldo MRS modificado, tendo como fonte de carbono a estaquiose ao invés da glicose. Isso foi feito com objetivo de selecionar as cepas capazes de metabolizarem eficientemente o oligossacarídeo estaquiose. O teor de estaquiose residual foi analisado por HPLC, utilizando-se o mesmo aparelho para a análise de ácidos orgânicos (item 3.2.1).

As cepas selecionadas foram identificadas através da prova bioquímica de fermentação de carboidratos, utilizando as galerias API 50 CHL da Biomérieux (ROSSAIRT; LUQUET,1994). As leituras de mudança de coloração foram feitas após 24 e 48 horas de incubação a 37°C.

3.3 ELABORAÇÃO DO INÓCULO

As etapas para a elaboração do inóculo consistiram no crescimento da bactéria selecionada (*L. agilis* LPB 56) em caldo MRS (pré-inóculo) e, em seguida, em caldo de feijão (inóculo), conforme a FIGURA 10.

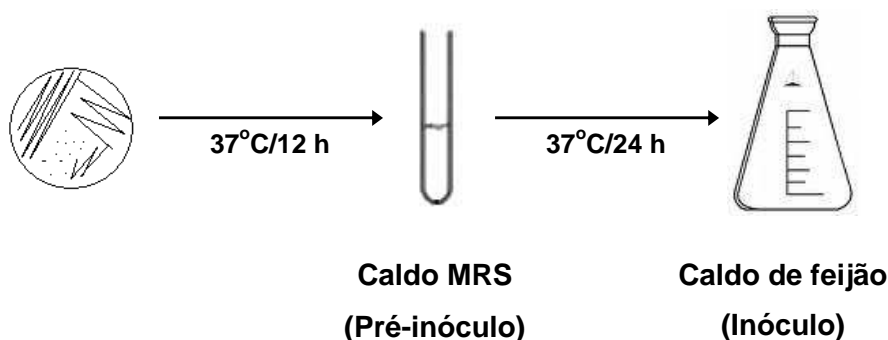


FIGURA 10 – ESQUEMA GERAL PARA A ELABORAÇÃO DO INÓCULO

FONTE: O AUTOR (2008)

3.3.1 Padronização do pré-inóculo

Colônias puras foram reativadas em 15 mL de caldo MRS e incubadas a temperatura de 37°C por 24 horas, sem agitação. Inoculou-se 10% (v/v) desse cultivo crescido em caldo MRS e incubou-se nas mesmas condições. Cinéticas de crescimento foram feitas, através de diluições seriadas e contagens de células viáveis, utilizando o método *drop plate* (HOBEN; SOMASEGARAN, 1982 citados por PRADO, 2007). Após a inoculação, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas até o aparecimento das colônias. A leitura da densidade óptica do cultivo foi feita simultaneamente em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm.

3.3.2 Padronização do inóculo

Estudos foram realizados com o objetivo de definir o número de repicagens necessárias à adaptação da cepa no caldo de feijão. Inoculou-se 10% (v/v) de um cultivo de *L. agilis* LPB 56, crescido em caldo MRS (aproximadamente 10^8 UFC/mL) a 37°C por 12 horas, sem agitação, em caldo de feijão (10%) (v/v). Foram realizadas contagens de células viáveis no tempo inicial (zero) e após 24 horas de incubação a 37°C. Uma alíquota de 10% foi retirada e novamente inoculada em caldo de feijão estéril. O cultivo foi incubado a 37°C, sem agitação, e contagens foram feitas novamente no tempo inicial (zero) e às 24 horas de incubação.

3.4 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO (CALDO DE FEIJÃO)

A FIGURA 11 mostra as etapas da elaboração do caldo de feijão.

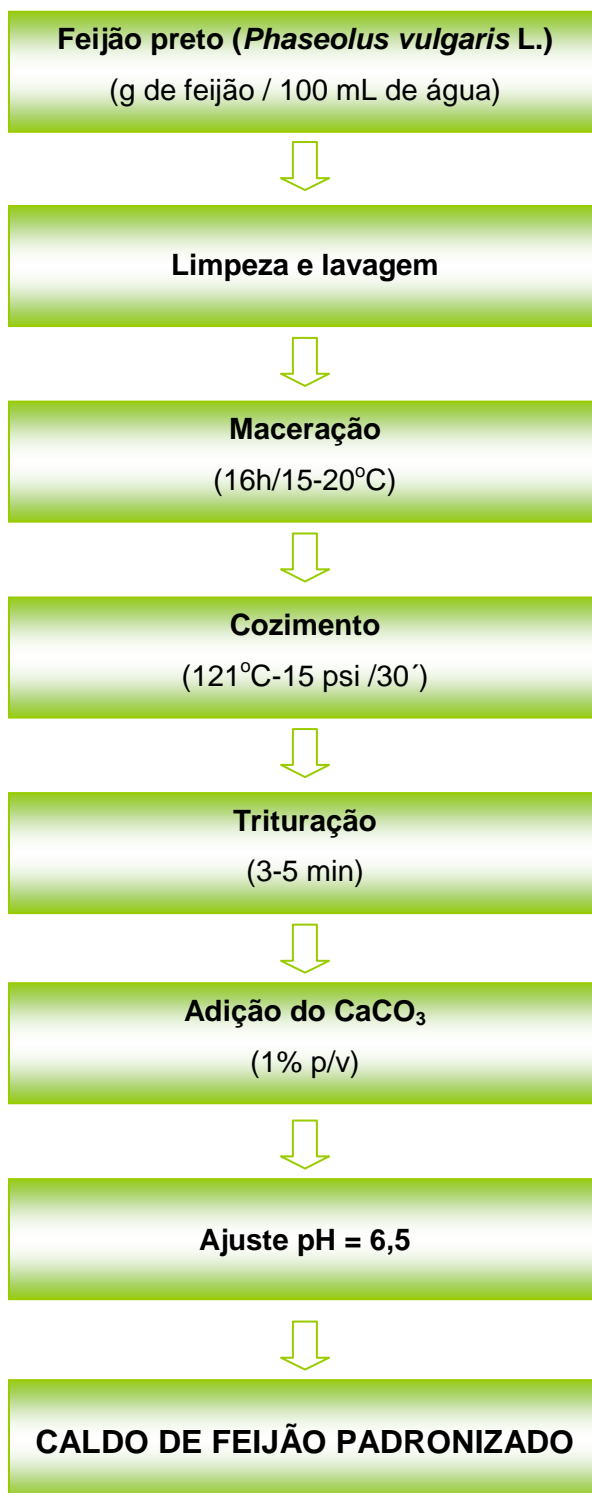


FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DA ELABORAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO

FONTE: O AUTOR (2008)

Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), variedade preto foi limpo, lavado e macerado por 16 horas a temperatura ambiente ($\pm 15-20^{\circ}\text{C}$), segundo a metodologia de Oliveira *et al.* (2001). A proporção de grãos de feijão:água foi de 10, 15 e 20 gramas de feijão cru para 100 mL de água destilada (10%, 15% e 20%, respectivamente).

Procedeu-se o cozimento do feijão macerado, juntamente com a água de maceração, em autoclave vertical, a temperatura de 121°C e pressão de 15 psi (≈ 1 atm), durante o período de 30 minutos (SAT; KELES, 2002). Os grãos cozidos juntamente com a água de cocção foram triturados em liquidificador na velocidade máxima (3) por 3 a 5 minutos, até a obtenção de um caldo homogêneo. Carbonato de cálcio (CaCO_3) foi adicionado como agente regulador de acidez na proporção de 1% (p/v) e o pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 2,5M.

3.5 FERMENTAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO

Na etapa de fermentação, o caldo de feijão padronizado foi esterilizado a 121°C -15psi por 15 minutos. O inóculo de *L. agilis* LPB 56 crescido previamente em caldo de feijão (10%) a 37°C por 24 horas, foi inoculado (10% v/v) em caldo de feijão (10, 15 e 20%) e incubado em diferentes condições de temperatura/tempo/agitação. Procedeu-se a secagem do caldo fermentado em estufa em diferentes condições de temperatura/tempo. Análises foram então realizadas para verificar as alterações, qualidade e aceitabilidade do produto final. O fluxograma geral do processo é mostrado na FIGURA 12.

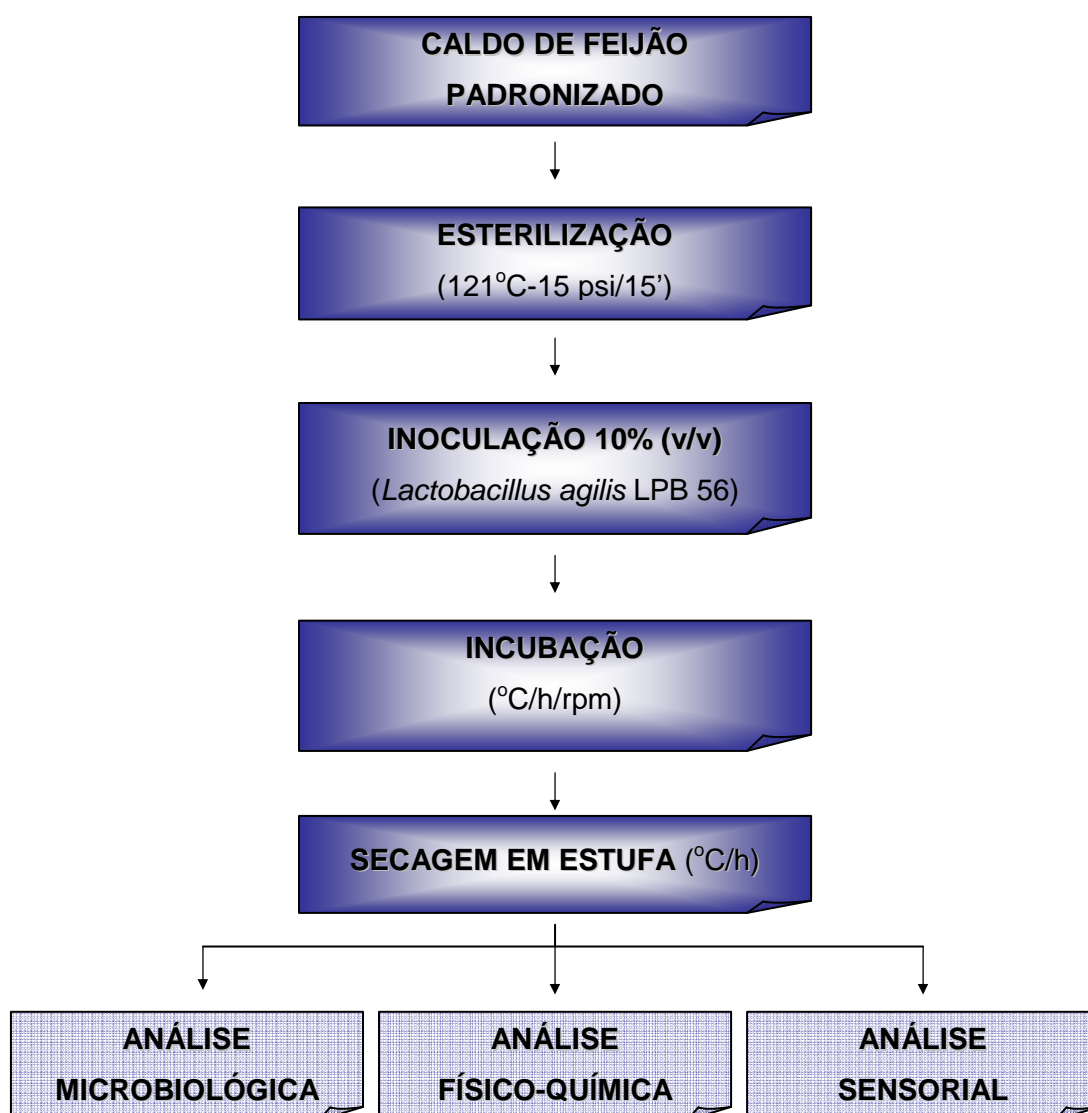


FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DO FEIJÃO FERMENTADO E DESIDRATADO
FONTE: O AUTOR (2008)

3.6 VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NO CONSUMO DA ESTAQUIOSE E DA RAFINOSE

Um estudo prévio foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de algumas variáveis sobre o consumo da estaquiose e rafinose do caldo de feijão. As variáveis estudadas foram concentração do caldo, temperatura de incubação e uso de um agente regulador de acidez (CaCO_3). Para esses testes foi utilizada uma taxa de inoculação de 10% de cultivos com 10^8UFC/mL . Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6.1 Influência da concentração do caldo

Avaliou-se o crescimento do *L. agilis* LPB 56 em caldos de feijão com concentrações de 10, 15 e 20% (p/v), incubados a 37°C por 24 horas, sem agitação. As contagens de células viáveis (método *drop plate*) foram feitas em placas com MRS ágar, incubadas 37°C por 24 horas.

3.6.2 Influência da temperatura

Foram realizadas cinéticas de crescimento do *L. agilis* LPB 56 em caldos de feijão incubados a 30 e 37°C por 24 horas, sem agitação. As contagens de células viáveis foram feitas em placas com MRS ágar, incubadas a 37°C por 24 horas.

3.6.3 Influência do carbonato de cálcio

Caldos de feijão com e sem carbonato de cálcio (1% p/v) foram inoculados com *L. agilis* LPB 56 e incubados a 37°C por 24 horas, sem agitação. Contagens de células viáveis foram feitas em placas de MRS, incubadas 37°C por 24 horas.

3.6.4 Otimização das variáveis

O planejamento estatístico utilizado para determinar as variáveis que influenciaram significativamente no consumo da estaquiose do caldo de feijão foi o Box-Behnken (1960), que reduziu significativamente o número de experimentos necessários. O método consistiu basicamente no planejamento fatorial clássico de quatro níveis (2^n) ($n=4$), acrescido de 3 pontos centrais que permitiram a estimativa dos coeficientes de segunda ordem ($2^4=16+3=19$ experimentos). As variáveis estudadas foram taxa de inóculo, temperatura de incubação, uso do CaCO_3 e da agitação. As fermentações foram feitas em erlenmeyers de 250 mL, incubados em estufas de cultivo e agitadores (shakers). A função resposta foi obtida através da análise de variância e de regressão, calculadas com o uso do software Statistica 6.0 (STATSOFT, 2001) em um nível de 95% de confiança, buscando-se os efeitos significativos dos tratamentos. As variáveis significativas foram analisadas segundo o Diagrama de Pareto.

De acordo com a resposta obtida no primeiro planejamento, estabeleceram-se as variáveis com significância no consumo da estaquiose. Estas variáveis foram estudadas em um segundo planejamento fatorial 2^n ($n=2$), o qual consistiu em 4 pontos principais com 2 pontos axiais e 3 repetições nos pontos centrais, totalizando 11 experimentos ($2^2=4+2\times 2+3=11$). A função resposta foi obtida através da análise de variância e de regressão (STATSOFT, 2001), e a faixa ótima de consumo da estaquiose foi representada pela Metodologia de Superfície de Resposta (BARROS; SCARMINO; BRUNS, 2005).

3.7 FERMENTAÇÕES EM ERLLENMEYERS E BIORREATOR

Com a determinação das melhores condições de consumo da estaquiose, realizaram-se fermentações em erlenmeyers (300 mL) em triplicata e em biorreator (6L) litros (MDL - B.E.Marubishi) (FIGURA 13) em duplicata. Foram coletadas amostras a cada 6 horas até às 30 horas de fermentação. Os parâmetros analisados foram contagens de células viáveis (crescimento celular), variação do pH, consumo dos oligossacarídeos estaquiose e rafinose e produção do ácido láctico por HPLC, e determinação da atividade da α -galactosidase (OLIVEIRA *et al.*, 2005).



FIGURA 13 – BIORREATOR USADO NA FERMENTAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO
FONTE: O AUTOR (2008)

3.7.1 Quantificação dos oligossacarídeos da Família Rafinose e do ácido láctico

Amostras de caldos de feijão foram diluídas 1:5 (v/v) e filtradas em membranas (Millipore) de diâmetro 0,22 μm . A análise foi feita em cromatógrafo SHIMADZU, coluna Aminex HPX 87H da BIO-RAD, fase móvel H_2SO_4 5mM, volume de injeção 20 μL , detector índice de refração. A vazão e a temperatura tiveram os valores ajustados para 0,35 mL/min e 45°C, respectivamente.

3.7.2 Atividade da α -galactosidase

A atividade da enzima α -galactosidase foi medida pela taxa de conversão do substrato sintético pNPGal (p-nitrofenil- α -D-galatopiranosídeo), conforme a metodologia de Oliveira *et al.* (2005). Os caldos de feijão foram centrifugados por 10 minutos na rotação de 12.000 rpm, e o sobrenadante foi diluído 1:5 em água destilada. Para os testes, foi utilizado um volume final de 1,0 mL, composto de 650 μL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250 μL de solução pNPGal 2 mM, 100 μL da preparação enzimática (0-0,03 mg de proteína) para o branco ou 100 μL da amostra diluída. A reação foi conduzida por 15 minutos em banho-maria a 40°C e interrompida pela adição de 1,0 mL de solução Na_2CO_3 0,5 M. Os valores de absorbância foram lidos no comprimento de onda de 410 nm e convertidos em μmoles de p-nitrofenolato (pNP), utilizando uma curva padrão construída com 0-0,20 μmoles de pNP a partir de uma solução estoque de concentração 2 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de proteína necessária para produzir 1 μmol de pNP por minuto nas condições de ensaio.

3.8 SECAGEM DO CALDO FERMENTADO

Após a etapa de fermentação, o caldo foi secado em estufa (sem circulação de ar) a 60, 80 e 100°C e estufa a vácuo regulada a 60°C. A secagem de cada porção do caldo (aproximadamente 800 gramas) foi feita em bandejas plásticas com 26,5 cm de comprimento x 19 cm de largura x 6 cm de altura. Partículas parcialmente desidratadas foram passadas em peneiras de 2 mm (ou 10 *mesh*) de diâmetro, para se obter um pó homogêneo, e para que a secagem fosse mais efetiva, devido a maior superfície de contato do ar quente com as partículas sólidas.

A monitoração da perda de umidade foi feita em balança determinadora de umidade por infravermelho, com temperatura de secagem regulada a 105°C. A secagem dos caldos foi realizada até que o teor de umidade estivesse entre 2 e 4%. Ao final da secagem, foi determinada também a atividade de água (A_w) do produto no aparelho AQUALAB CX-2.

3.8.1 Uso da centrifugação

Caldos fermentados foram centrifugados durante 15 minutos a 4700 rpm. Pesaram-se 800 gramas do sedimento, passando-o em peneira de 2 mm (ou 10 *mesh*). As partículas foram então colocadas em bandejas plásticas e levadas a estufa a 80°C. A perda de umidade foi monitorada até um teor entre 2 e 4% e a atividade de água foi medida ao final da secagem.

3.9 ANÁLISES FÍSICAS

Análises físicas do feijão fermentado e desidratado foram realizadas. Os parâmetros avaliados foram solubilidade e capacidade de intumescimento das partículas. Também foi determinada a viscosidade dos caldos após a etapa de rehidratação.

3.9.1 Solubilidade e capacidade de intumescimento

A determinação da solubilidade foi feita segundo a metodologia de Anderson *et al.* (1969). A medida da capacidade de intumescimento das partículas foi baseada em Tester e Morrison (1990). Pesou-se 0,8 grama do feijão desidratado, suspendeu-se em 30 mL de água destilada, deixando-se em banho maria a 95°C por 30 minutos. A suspensão foi resfriada a 20°C e centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante e o sedimento foram secados em estufa a 100°C. Os pesos das amostras secas foram determinados em balança analítica.

As fórmulas usadas foram:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Peso sobrenadante seco} \times 100}{\text{Peso amostra} \times (1 - A)}$$

$$\text{Capacidade de intumescimento (\%)} = \frac{\text{Peso sedimento seco} \times 100}{\text{Peso amostra} \times (1 - A) \times (100 - \% \text{ solubilidade})}$$

Onde:

A = teor de umidade (%) em base seca

3.9.2 Determinação da viscosidade após a rehidratação

Os tratamentos para a rehidratação do feijão fermentado e desidratado consistiram na dissolução em água fervente (98°C), prévia hidratação em água ($\pm 15^\circ\text{C}$) e fervura (98°C), e dissolução em água ($\pm 15^\circ\text{C}$) e fervura (98°C). A fervura foi realizada em béqueres aquecidos diretamente em chapa elétrica. Os tempos de fervura foram de 5 e 10 minutos. A viscosidade dos feijões rehidratados foi medida em viscosímetro (BROOKFIELD DV-II + PRO), com spindle 3 e leituras em 10 e 20 rpm. Os resultados foram expressos em centipoise (cP) e a proporção usada foi de 15 gramas de pó de feijão para 100 mL de água.

3.10 ANÁLISES QUÍMICAS

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Química Analítica do Setor de Tecnologia de Alimentos. As amostras analisadas foram grãos de feijão cru, caldo de feijão estéril (não fermentado), caldo de feijão fermentado e caldo de feijão fermentado e desidratado (em pó). Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.10.1 Determinação da umidade e sólidos totais

Pesaram-se 5 gramas da amostra em cadinho, secando o material em estufa a 105°C por 24 horas ou até peso constante (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 2000). A umidade foi calculada através da fórmula:

$$\text{Umidade (g/100g de matéria seca)} = \frac{(B \times 100)}{A}$$

Onde:

B = diferença entre o peso da amostra úmida e peso da amostra seca

A = peso da amostra úmida

Os sólidos totais (matéria seca) foram calculados pela diferença entre 100 e a umidade.

3.10.2 Determinação de proteínas

As proteínas foram determinadas pelo nitrogênio total, utilizando o método de Kjeldahl e o fator 6,25 para conversão em proteína, conforme método 955.04C descrito pela AOAC (2000). Pesou-se 0,5 grama e transferiu-se para o balão de Kjeldahl. Adicionou-se 4 gramas de catalisador (sulfato de cobre e sulfato de potássio na proporção de 1:3) e 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Aqueceu-se no digestor por aproximadamente 2 horas, até a obtenção de uma solução de cor clara. Deixou-se esfriar e adicionou-se 150 mL água destilada. Em seguida, acrescentou-se 150 mL de hidróxido de sódio a 40% (p/v) e 2 a 3 grânulos de zinco metálico. Destilou-se a solução e recebeu-se a porção destilada em uma solução de H_2SO_4 0,1 N contendo o indicador vermelho de metila. Titulou-se em NaOH 0,1 N até a coloração amarela. A porcentagem de proteínas foi determinada pela fórmula a seguir:

$$\% \text{ de proteínas} = \frac{(B-A) \times F \times 0,0014 \times 100 \times 6,25}{P}$$

Onde:

B = volume gasto de NaOH 0,1 N na titulação da prova em branco (mL)

A = volume gasto de NaOH 0,1 N na titulação da amostra (mL)

F = fator da solução de 0,1 N

P = peso da amostra

3.10.3 Determinação de lipídios

O extrato etéreo (lipídios) foi determinado pela extração com éter de petróleo durante 5 horas em extrator de Soxhlet, conforme método 920.39C da AOAC (2000). Pesaram-se 2 gramas da amostra em papel filtro e transferiu-se para um cartucho de celulose. Procedeu-se a extração com éter de petróleo em aparelho de Soxhlet e ao final das 5 horas o resíduo obtido foi secado em estufa a 105°C por 1 hora e pesado. O cálculo da quantidade de lipídios foi feito através da fórmula a seguir:

$$\% \text{ de lipídios} = \frac{\text{peso do resíduo seco} \times 100}{\text{peso da amostra}}$$

3.10.4 Determinação das cinzas

As cinzas foram determinadas pela calcinação em mufla a 550°C, de acordo com o método 900.02A da AOAC (2000). Pesaram-se 5 gramas da amostra, procedendo a incineração-se em mufla por 5 horas até o resíduo adquirir coloração branca ou cinza esbranquiçada. A porcentagem foi determinada pela fórmula a seguir:

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{\text{peso do resíduo seco} \times 100}{\text{peso da amostra}}$$

3.10.5 Determinação da fibra bruta

A determinação da fibra bruta foi feita por extração e posterior quantificação gravimétrica, segundo a AOAC (2000). Pesaram 2 a 3 gramas da amostra e transferiu-se para um erlenmeyer de 600 mL. Acrescentou-se 200 mL de uma solução de HCl 1,25% (v/v) adaptando o frasco a um sistema de refluxo em ebulição por 30 minutos. O erlenmeyer, foi então, removido e a solução filtrada em papel faixa preta, lavando-se com água quente.

O resíduo foi transferido para o mesmo erlenmeyer e 200 mL de uma solução de NaOH 1,25% (p/v) foram acrescentados. Novamente, essa solução ficou em refluxo por 30 minutos. O frasco foi removido e a solução filtrada em papel faixa

preta, lavando o resíduo retido com água quente, até que o filtrado não acusasse reação alcalina com o papel indicador universal. Procedeu-se a lavagem do resíduo com 20 mL de álcool etílico, seguida de uma última lavagem com 20 mL de éter etílico. Secou-se em estufa a 105°C por 2 horas, esfriou-se em dessecador e pesou-se. A fórmula da determinação da fibra bruta é mostrado a seguir:

$$\% \text{ de fibra bruta} = \frac{A \times 100}{\text{peso da amostra}}$$

Onde:

A = diferença de peso do filtro com o resíduo seco e do papel filtro seco

3.10.6 Determinação dos carboidratos totais

Os carboidratos totais foram calculados por diferença: 100 – (% proteína + % cinzas + % lipídios totais + % fibra bruta).

3.10.6.1 Determinação da estaquiose e rafinose e do ácido láctico

A determinação dos oligossacarídeos estaquiose e rafinose dos grãos de feijão (cru) foi realizada com uma etapa prévia de extração. A metodologia usada baseou-se em Xiaoli *et al.* (2008). Para a extração, os grãos foram triturados em liquidificador até a obtenção de um pó fino. Pesou-se 1 grama do pó e diluiu-se em 9 mL de solução aquosa de etanol (50% v/v). Deixou-se em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. Centrifugações foram realizadas, após cada extração em 10.000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes dos três ciclos de extração foram então evaporados em estufa a vácuo a 40°C. O resíduo seco foi ressuspensionado em 10 mL de água purificada (MilliQ) e filtrado em membrana (Millipore) de diâmetro 0,22 µm.

As amostras de caldo de feijão não fermentado e fermentado, e feijão em pó foram diluídas 1:10 em água purificada (MilliQ) e filtradas em membrana (Millipore) de diâmetro 0,22 µm. A análise foi feita em cromatógrafo SHIMADZU, coluna

Aminex HPX 87H da BIO-RAD, fase móvel H₂SO₄ 5mM, vazão 0,35 mL/min, 45°C, volume de injeção 20 µL, detector índice de refração.

3.10.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo Programa Statistica versão 6.0 (STATSOFT, 2001), por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey $p < 0,05$, utilizando um delineamento em blocos inteiramente casualizado.

3.11 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Análises microbiológicas do caldo de feijão fermentado e desidratado foram realizadas de acordo com a resolução RDC nº 12 da Anvisa (BRASIL, 2001). Os padrões estabelecidos foram os mesmos do grupo de hortaliças, legumes e similares, incluindo cogumelos (fungos comestíveis) – secos, desidratados ou liofilizados, incluindo cogumelos. Os microrganismos analisados foram coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp.

3.12 ANÁLISE SENSORIAL

Através do método afetivo ou subjetivo (DUTCOSKY, 1996) avaliou-se a aceitação do pó de feijão fermentado, reconstituído em água, na forma similar a uma sopa de feijão.

A avaliação sensorial foi feita no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná. Participaram do teste 40 provadores não treinados, consumidores de feijão, de idade entre 18 e 40 anos e grau de escolaridade de ensino médio a superior. As amostras foram apresentadas aos julgadores em copos plásticos de poliestireno de 50 mL codificados aleatoriamente com três dígitos (ABNT, 1994).

Os dados foram baseados em um questionário fornecido aos provadores (APÊNDICE 2), utilizando a escala hedônica de 9 pontos para avaliar o grau de aceitação das amostras. Três amostras foram consecutivamente avaliadas: feijão reconstituído sem tempero (controle), feijão reconstituído com adição de sal (4% p/v) e feijão reconstituído com adição de condimento a base de legumes (7% p/v).

Os dados coletados foram analisados estatisticamente pelo Programa Statistica versão 6.0 (STATSOFT, 2001) através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey $p < 0,05$, utilizando um delineamento em blocos inteiramente casualizado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS

Das 16 cepas isoladas em meio MRS 9 cepas foram caracterizadas como pertencentes ao grupo de bactérias ácido lácticas: OS 401 (ovos de peixe), BO 101 (bolsa de peixe), C 102 e C103 (colostro bovino), F 103 (fezes bovina), FJ 101 e FJ 102 (caldo de feijão cozido), LPB 56 e Y 301 (estoque-padrão do laboratório). Os resultados dos testes de caracterização são mostrados na TABELA 7.

TABELA 7 – RESULTADOS DOS TESTES DE CARACTERIZAÇÃO DAS BAL

Código	Coloração de Gram	Atividade da catalase	Produção de gás	Morfologia das colônias	% de ácido láctico produzido
OS 401	+	-	-	Bastonetes	62,7%
BO 101	+	-	-	Cocos	59,0%
Y 301	+	-	-	Bastonetes	65,3%
FJ 101	+	-	+	Cocos	57,8%
FJ 102	+	-	-	Bastonetes	58,9%
C 102	+	-	-	Bastonetes	58,3%
C 103	+	-	-	Bastonetes	71,1%
F 103	+	-	-	Bastonetes	76,4%
LPB 56	+	-	-	Bastonetes	100%

As bactérias isoladas foram previamente classificadas como lácticas, já que, atenderam os requisitos descritos por Schleifer e Ludwig (1995) de que todas as bactérias lácticas são Gram positivas e catalase negativas, embora algumas raras exceções apresentam pseudo-catalase. Também, segundo esses autores, as BAL apresentam-se na forma de cocos ou bastonetes (bacilos).

Apenas a cepa FJ 101 produziu gás a partir da glicose, o que poderia classificá-la como bactéria heterofermentativa (HAMMES; VOGEL, 1995). Segundo a classificação desses autores, apenas a cepa LPB 56 poderia ser classificada como homofermentativa obrigatória, já que ela produziu exclusivamente (>85%) ácido láctico. As outras cepas poderiam ser classificadas com heterofermentativas facultativas, já que produziram quantidades superiores a 50% de ácido láctico e não

produziram dióxido de carbono (exceto a cepa FJ 101, que não produziu quantidades equimolares de lactato, etanol e dióxido de carbono).

4.2 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS

A fim de selecionar bactérias com capacidade de metabolizar oligossacarídeos da Família Rafinose, realizaram-se fermentações com as 8 bactérias isoladas, em caldo MRS modificado (substituindo a mesma quantidade de glicose pela estaquiose), incubando-se a 37°C por 24 horas, sem agitação.

Através de análise por HPLC, foi observado um maior consumo da estaquiose inicial pelas bactérias LPB 56 e FJ 102. A bactéria LPB 56 foi capaz de metabolizar 68,4%, enquanto que, a bactéria FJ 102 utilizou 63,3% da estaquiose, considerando uma concentração inicial de estaquiose de 26g/L.

O crescimento das bactérias (LPB 56 e FJ 102) foi similar no meio MRS modificado, com um aumento no número de células viáveis de aproximadamente 2 log (FIGURA 14).

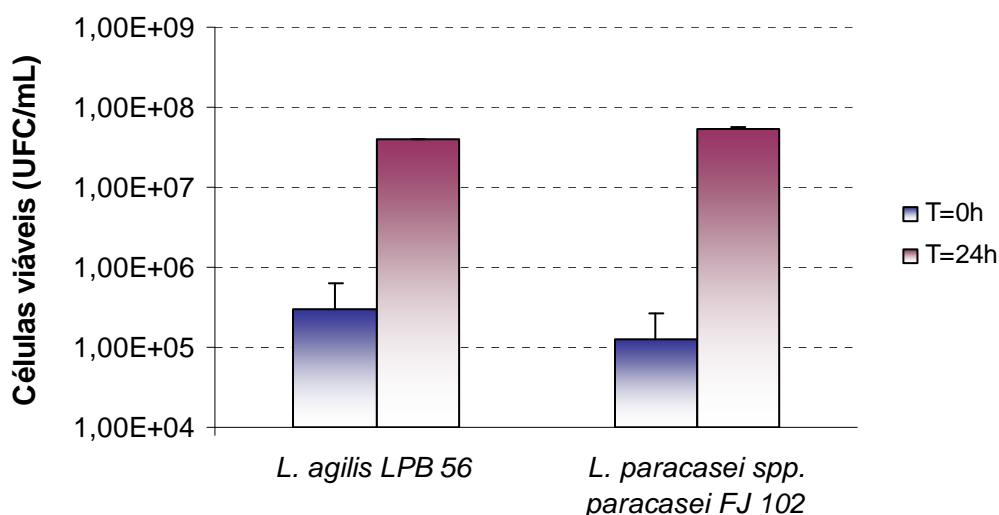


FIGURA 14 – CRESCIMENTO DAS BAL SELECIONADAS EM MRS MODIFICADO

FONTE: O AUTOR (2008)

Em seguida, as duas bactérias foram identificadas através da prova bioquímica de fermentação de carboidratos (Kit API 50 CHL - Biomérieux). Os resultados classificaram a cepa LPB 56 como *Lactobacillus agilis* e a cepa FJ 102 como *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* 1, conforme a FIGURA 15.



FIGURA 15 – GALERIAS API 50 CHL (Biomérieux) USADAS NA IDENTIFICAÇÃO DA CEPA FJ 102

4.2.1 Seleção da BAL cultivada em caldo de feijão

A fim de avaliar o comportamento das BAL identificadas, realizaram-se fermentações preliminares em caldo de feijão (37°C/24-48h), utilizando-se 10% (10^8 UFC/mL) de cultivos crescidos em caldo MRS (37°C/24h).

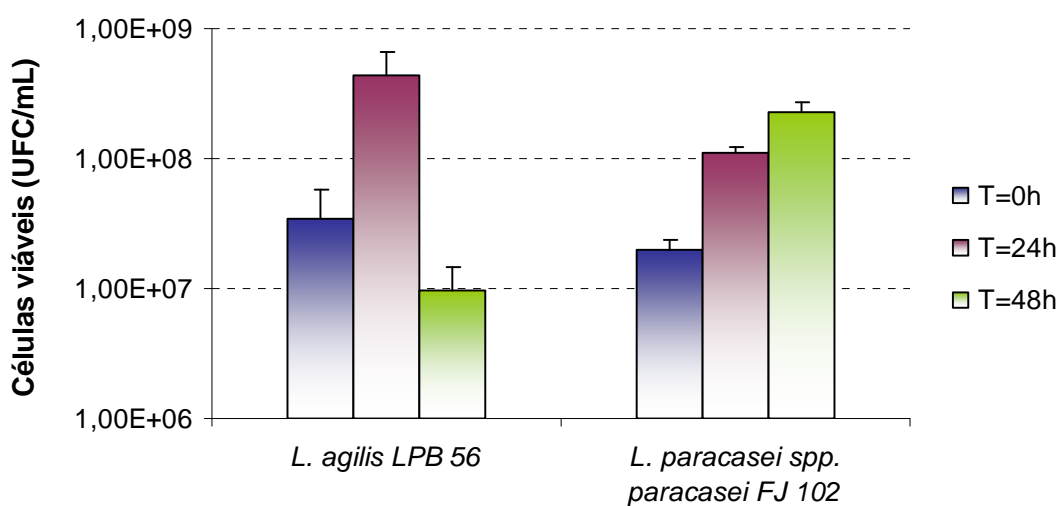


FIGURA 16 – CRESCIMENTO DO *L. agilis* LPB 56 e *L. paracasei* FJ 102 EM CALDO DE FEIJÃO

FONTE: O AUTOR (2008)

De acordo com o gráfico (FIGURA 16) pôde-se observar que às 24 horas o crescimento do *L. agilis* LPB 56 no caldo de feijão foi maior quando comparado ao *L. paracasei* FJ 102. O *L. agilis* LPB 56 teve um aumento de $3,5 \times 10^7$ para $4,4 \times 10^8$ UFC/mL, sendo constatado, para o *L. paracasei* FJ 102 um crescimento inferior a 1 log ($2,0 \times 10^7$ para $1,1 \times 10^8$ UFC/mL). Às 48 horas, no entanto, foi verificada uma relevante diminuição das células viáveis do *L. agilis* LPB 56 (superior a 1 log), que pode ser justificado pela acidificação do meio, o qual apresentou pH em torno de 4,0 neste período. Para o *L. paracasei* FJ 102 pouca variação na concentração de células viáveis foi observada às 48 horas.

Apesar do crescimento de ambas as cepas no caldo de feijão, pôde-se constatar que apenas o *L. agilis* LPB 56 foi capaz de reduzir o conteúdo de estaquiose do caldo de feijão de 9,3 para 2,7 g/L (68%), tendo uma leve redução para 2,2 g/L às 48 horas de fermentação (FIGURA 17).

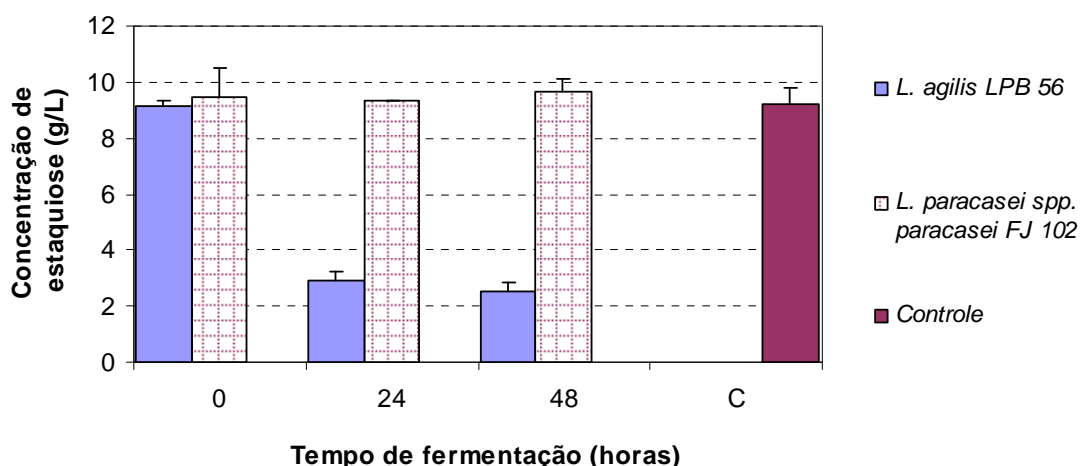


FIGURA 17 - VARIAÇÃO NO TEOR DA ESTAQUIOSE EM CALDO DE FEIJÃO FERMENTADO POR BAL

FONTE: O AUTOR (2008)

A utilização da estaquiose foi confirmada pela produção do ácido láctico. *L. agilis* LPB 56 produziu 13,87 g/L de ácido láctico, enquanto o *L. paracasei* FJ 102 somente 3,61 g/L às 48 horas de fermentação. Foi verificado também que o *L. paracasei* FJ 102 produziu 3,08 g/L de ácido acético, que juntamente com o láctico, foram responsáveis pela queda do pH de 6,5 para 5,5. A fermentação do caldo de feijão pelo *L. agilis* LPB 56 levou a um pH final igual a 4,0.

Logo, selecionou-se o *Lactobacillus agilis* LPB 56 para os estudos de fermentação, visto a sua capacidade de metabolizar a estaquiose presente no caldo de feijão e as alterações sensoriais previamente detectadas, consideradas interessantes ao desenvolvimento de um novo produto.

4.2.2 *Lactobacillus agilis* LPB 56

Através de observação microscópica foi observado que o microrganismo selecionado *L. agilis* LPB 56 é uma bactéria Gram positiva que se apresenta na forma de bastonetes em cadeia ou não (FIGURA 18). É também catalase negativo e não produz gás a partir da glicose.

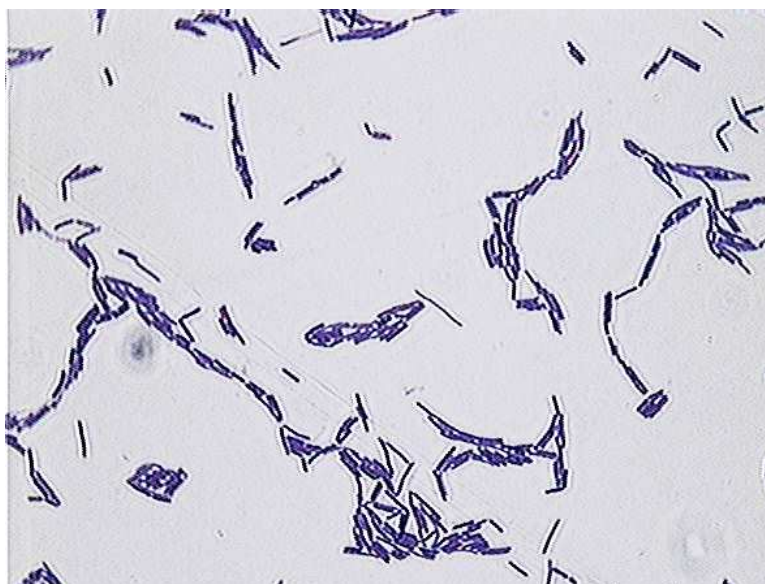


FIGURA 18 – VISUALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓPTICA DO *Lactobacillus agilis* LPB 56 (AUMENTO DE 100 X)

FONTE: O AUTOR (2008)

De acordo com a classificação de Schleifer e Ludwig (1995) bactérias pertencentes a este grupo apresentam metabolismo heterofermentativo facultativo. No entanto, quando cultivada em meio MRS, verificou-se, através de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) que a espécie em estudo apresentou metabolismo homofermentativo obrigatório, produzindo exclusivamente o

ácido láctico. Esse fato pôde ser confirmado pela não produção de gás a partir da glicose, o que não a classificaria como bactéria heterofermentativa (HAMMES; VOGEL, 1995). Uma possível explicação seria que a bactéria estudada poderia pertencer a uma nova linhagem desse grupo ou ter sofrido alguma mutação genética que tenha interferido em seu metabolismo fermentativo.

4.3 ELABORAÇÃO DO INÓCULO

A preparação do inóculo envolveu as etapas de cultivo do *Lactobacillus agilis* LPB 56 em meio MRS com a sucessiva adaptação em caldo de feijão.

4.3.1 Padronização do pré-inóculo

Para determinar o período de maior viabilidade celular (fase de crescimento exponencial) do inóculo foram realizadas cinéticas de crescimento do *Lactobacillus agilis* LPB 56 em caldo MRS, incubando-o a 37°C durante 24 horas, sem agitação (FIGURA 19).

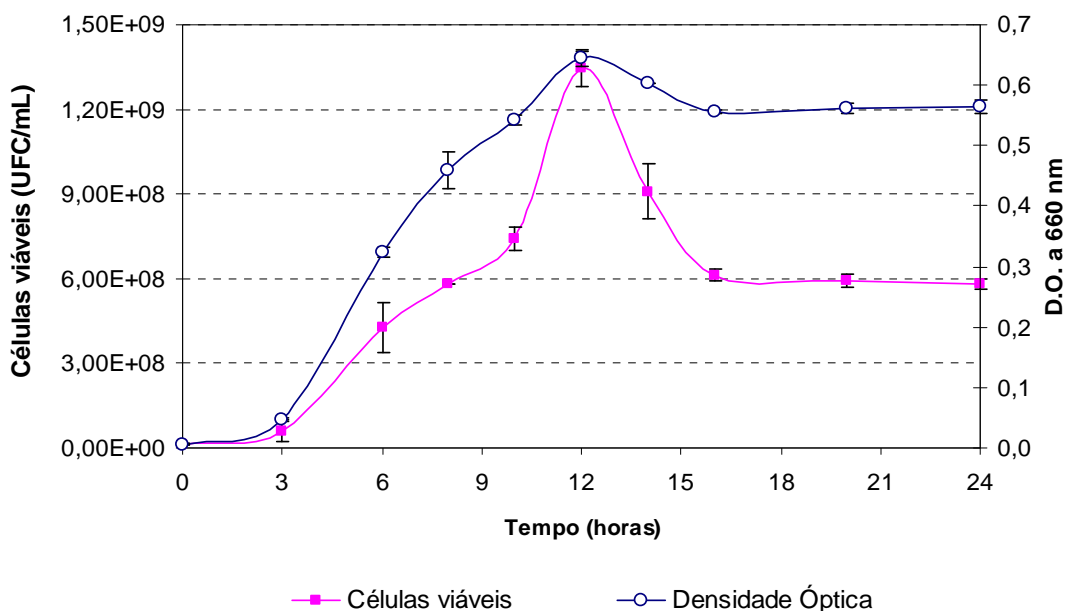


FIGURA 19 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *Lactobacillus agilis* LPB 56 EM MEIO MRS

FONTE: O AUTOR (2008)

Os resultados da cinética mostraram que o crescimento máximo da bactéria foi às 12 horas de incubação, com aumento do número de células de $1,2 \times 10^7$ para $1,3 \times 10^9$ UFC/mL nesse período, o que correspondeu também ao maior valor de absorbância do cultivo ($DO_{660\text{ nm}} = 0,644$). Foi estabelecido, portanto que, 12 horas de incubação seriam suficientes para se obter um cultivo com boa viabilidade, tendo em vista uma concentração padrão de 10^7 ou 10^8 UFC/mL no pré-inóculo.

4.3.2 Padronização do inóculo

A prévia adaptação da bactéria no caldo de feijão visou minimizar a perda da viabilidade no início das fermentações. As FIGURAS 20 e 21 mostram o comportamento do *L. agilis* LPB 56 em caldo de feijão, quando previamente adaptado ou não.

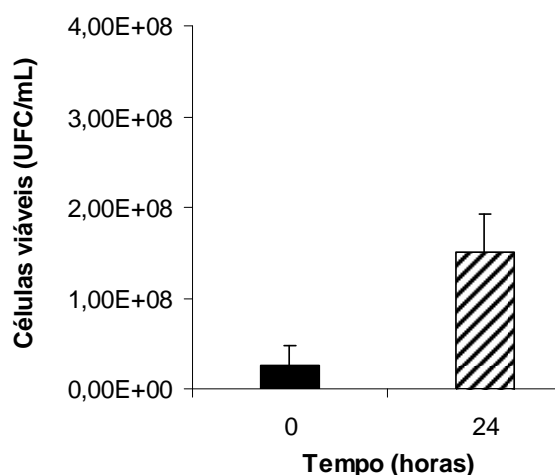


FIGURA 20 – CRESCIMENTO DO *L. agilis* LPB 56 EM CALDO DE FEIJÃO (INÓCULO CULTIVADO EM MRS) (1ª ETAPA)

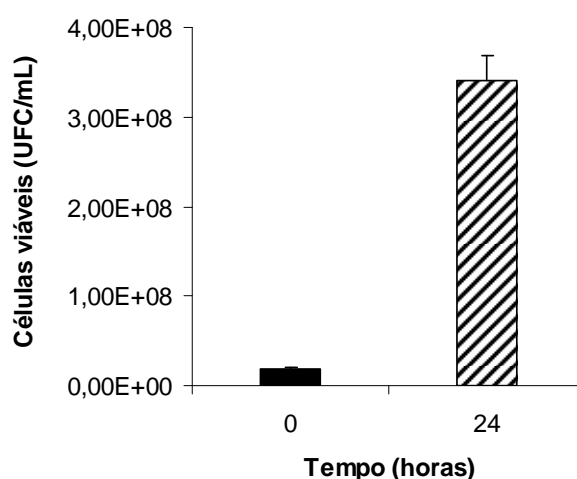


FIGURA 21 – CRESCIMENTO DO *L. agilis* LPB 56 EM CALDO DE FEIJÃO (INÓCULO CULTIVADO EM CALDO DE FEIJÃO (2ª ETAPA)

FONTE: O AUTOR (2008)

Quando o *Lactobacillus agilis* LPB 56 foi cultivado em caldo MRS (37°C/12h) e inoculado (10% v/v) em caldo de feijão (10%) o aumento do número células observado após 24 horas de incubação a 37°C foi inferior a 1 log. No entanto, quando o mesmo cultivo crescido em caldo de feijão (37°C/24h) foi

inoculado em um novo caldo de feijão estéril (10% v/v), verificou-se um incremento no número de células superior a 1 log, após 24 horas de incubação a 37°C, sem agitação. A diferença no número de células viáveis entre o inóculo cultivado em MRS e em caldo de feijão foi de aproximadamente $2,0 \times 10^8$ UFC/mL, mostrando que a etapa de adaptação da bactéria foi importante para se obter uma cultura com maior viabilidade.

A perda na viabilidade da bactéria pode ter ocorrido em função da mudança de um meio sintético (MRS), rico em nutrientes de fácil metabolização, para um meio mais complexo (caldo de feijão). Ao contrário do meio sintético, o caldo de feijão possui polissacarídeos e oligossacarídeos que precisam ser, primeiramente, hidrolisados para serem utilizados na manutenção da célula e na produção de metabólitos. Isso pode ter influenciado a atividade metabólica da célula, causando a morte de uma parte da população bacteriana.

Essa prática de adaptação do inóculo em caldo de feijão foi então usada em todos os ensaios de fermentação.

4.4 PREPARO DO CALDO DE FEIJÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) variedade preto foi escolhido para o presente estudo, visto que, constitui um prato típico brasileiro – a feijoada – sendo consumido, especialmente nestas ocasiões, em grande quantidade.

A etapa de maceração do feijão visou uma diminuição no tempo de cozimento, melhorando a rigidez dos grãos. Feijões previamente macerados tiveram textura menos consistentes em relação aos não macerados durante o mesmo tempo de cozimento (GOYCOOLEA *et al.*, 1990). Segundo Abu-Ghannam (1998) o estágio inicial de hidratação é realizado com o objetivo de facilitar o cozimento, melhorar a aparência e auxiliar a desnaturação protéica e a gelatinização do amido.

Além de provocar mudanças na textura, a maceração ajuda a aumentar a digestibilidade do feijão. Estudos realizados por Jood, Chauhan e Kapoor (1989) e Barampama e Simard (1994) avaliaram a digestibilidade *in vitro* da proteína de feijão (*Phaseolus vulgaris*), mostrando que esta etapa causou um aumento na digestibilidade da proteína.

O período de maceração usado nesse estudo (16 horas) esteve de acordo com o período recomendado Chiaradia e Gomes (1997), que deve estar entre 12 a

24 horas, já que, tempos prolongados, poderiam ocasionar contaminações bacterianas.

Barampama e Simard (1994 e 1995) demonstraram que existe uma importante diminuição nos oligossacarídeos tipo rafinose, amido e outros fatores antinutricionais em feijão cozido e feijão macerado e cozido. Onyenekwe, Njoku, e Ameh (2000) constataram que a etapa de maceração do feijão-de-corda até 16 horas reduziu os níveis de rafinose e estaquiose.

Somiari e Balogh (1993) e Silva e Braga (1982) sugeriram que, além do processo de lixiviação, o conteúdo de oligossacarídeos sofre uma diminuição devido a ativação de enzimas como α -galactosidases e invertases, similar ao processo de brotamento, resultando na degradação desses açúcares. Oliveira *et al.* (2001) discutiram o uso da maceração apoiando-se nos estudos de Baldini, Draetta e Yong (1985), que demonstraram a existência da enzima α -galactosidase em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L., cv. Carioca 80), relatando que com esta etapa existiriam condições para a ativação da enzima, causando a clivagem das ligações α -1,6-galactosídicas.

Vidal-Valverde, Frias e Valverde (1993) verificaram alterações na composição do feijão comum após o processo de maceração e cozimento. Eles constataram uma redução considerável de monossacarídeos e oligossacarídeos, particularmente, quando a água de maceração e cozimento era drenada.

Porém, sabe-se que a maceração causa a perda de nutrientes solúveis por lixiviação, como por exemplo proteínas, vitaminas e minerais (KATARIA; CHAUHAN; PUNIA, 1992; BARAMPAMA; SIMARD, 1995) e que ela ainda não é suficiente para causar uma redução significativa dos oligossacarídeos (PRICE *et al.*, 1988). Portanto, no presente trabalho optou-se pela não eliminação da água de maceração, objetivando simplificar o processo e fornecer maior quantidade de nutrientes para a etapa de fermentação. Dessa forma, pôde-se avaliar a eliminação dos fatores de flatulência somente através do processo fermentativo.

O uso de cozimento sob pressão 121°C/15psi por 30 minutos foi baseado nos estudos de Sat e Keles (2002). Eles constataram que o cozimento sob pressão por 30 minutos foi mais efetivo na degradação dos açúcares que o cozimento em ebulição por 60 minutos. De acordo com os autores citados em Lemos *et al.* (2004) o cozimento do grão de feijão sofre influência de fatores como a própria cultivar,

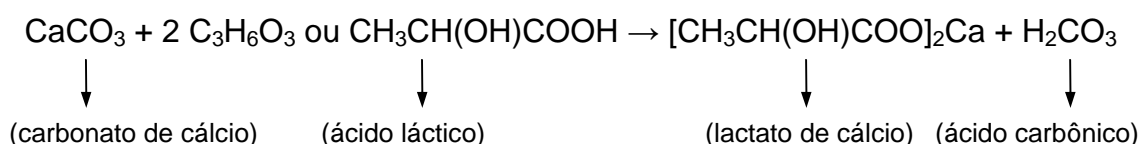
tempo transcorrido após a colheita e histórico do armazenamento, condições ambientais e temperatura e sistema utilizado no processo de cocção.

Bressani, Elias e España (1981) avaliaram a relação entre a cor e algumas propriedades físicas de feijões e observaram que o tempo de cocção foi menor para os feijões brancos do que para os feijões pretos e vermelhos.

4.4.1 Uso do carbonato de cálcio

O carbonato de cálcio foi utilizado com o objetivo de manter a concentração de ácido láctico livre no meio, prevenindo a inibição da bactéria. A legislação permite o uso do CaCO_3 como agente de firmeza, antiumectante e regulador de acidez (BRASIL, 1999).

A quantidade de carbonato de cálcio foi estabelecida com base na concentração de ácido láctico produzido durante a fermentação. No caso da fermentação láctica, a quebra de uma molécula de açúcar ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) com peso molecular de 180g/mol geraria 2 moléculas de ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) de peso molecular igual a 90g/mol. A adição de 1 mol de CaCO_3 (peso molecular = 100g/mol) resultaria na reação a seguir:



Segundo Sarhaddar *et al.* (1997) o carbonato de cálcio é geralmente usado na fermentação láctica para controlar o pH, resultando em lactato de cálcio como produto final.

Na realização de ensaios preliminares observou-se uma produção de aproximadamente 20g/L de ácido láctico. Logo, a quantidade de CaCO_3 foi determinada com base na relação:

$$\begin{array}{l} 90 \text{ g/mol de } \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 \text{ (ácido láctico)} \times 2 \text{ ou } 180 \text{ g/mol de } \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 \text{ — } 20 \text{ g/L} \\ 100 \text{ g/mol de } \text{CaCO}_3 \text{ — } x \\ x = 11 \text{ g/L ou } 1,1\% \text{ ou } 1,1 \text{ g/100mL} \end{array}$$

Portanto, 1 mol de CaCO_3 (peso molecular = 100g/mol) seria suficiente para neutralizar 2 mol de ácido láctico. A concentração de CaCO_3 estabelecida, portanto, foi de 1% (p/v), objetivando a manutenção do pH e viabilidade das células.

4.5 FERMENTAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO

Foram estudadas algumas condições (variáveis) que poderiam exercer influência sobre o crescimento da bactéria láctica selecionada (*L. agilis* LPB 56) no caldo de feijão. As variáveis analisadas foram a concentração do caldo de feijão (10 e 15% p/v), temperatura de incubação (30 e 37°C) e uso do carbonato de cálcio (0 e 1% p/v).

Nesta etapa todas as fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL como mostra a FIGURA 22.

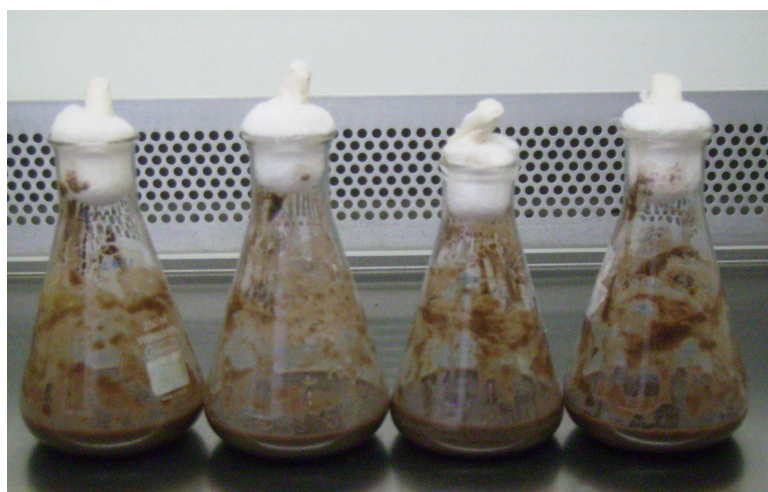


FIGURA 22 – FERMENTAÇÃO DE CALDO DE FEIJÃO EM ERLENMEYERS

FONTE: O AUTOR (2008)

4.5.1 Influência da concentração do caldo de feijão

Foram elaborados, inicialmente, caldos de feijão com três concentrações (10, 15 e 20% p/v). A maior concentração (20%), no entanto, não permitiu uma manipulação satisfatória, gerando dados com muita discrepância. Logo, utilizaram-se somente os caldos com concentrações de 10 e 15% nos ensaios de fermentação.

O crescimento do *L. agilis* LPB 56 em caldos de feijão com concentrações de 10 e 15% é mostrado na FIGURA 23.

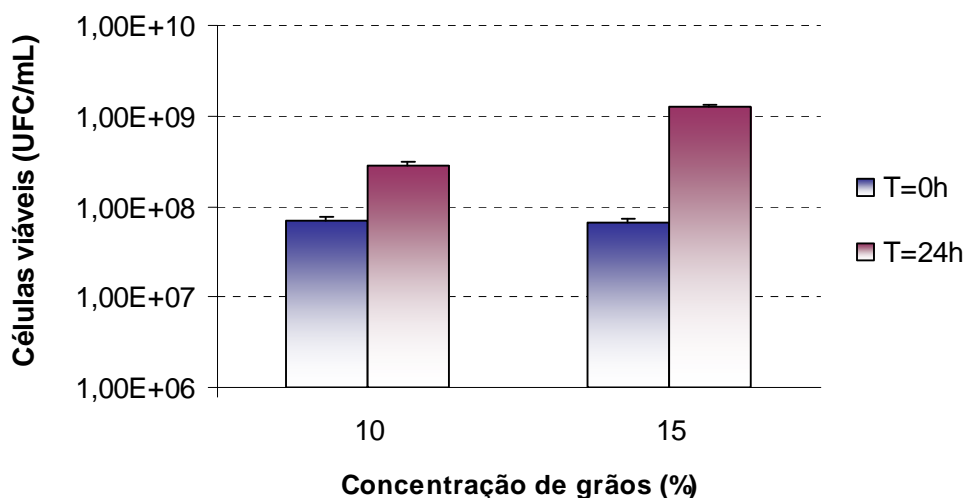


FIGURA 23 – CRESCIMENTO DO *L. agilis* LPB 56 EM CALDOS DE FEIJÃO COM CONCENTRAÇÕES DE 10 E 15%

FONTE: O AUTOR (2008)

Foi observado um maior incremento do número de células viáveis na maior concentração testada (15%). O crescimento da bactéria láctica em caldo de feijão (10%) foi inferior a 1 log, enquanto que, em caldo de feijão (15%) este foi superior a 1 log, após 24 horas de incubação a 37°C, sem agitação. A variação do pH em ambos os meios foi similar, chegando a 4,0 às 24 horas.

A maior quantidade de nutrientes no meio (15%) possibilitou um melhor crescimento da bactéria, além de proporcionar uma condição operacional satisfatória. Essa concentração foi usada, então, em todos os ensaios de fermentação posteriores.

4.5.2 Influência da temperatura

O estabelecimento da temperatura de incubação baseou-se nos estudos de Karp (2007), que utilizou a mesma cepa, *Lactobacillus agilis* LPB 56, para a produção de ácido láctico, incubando a cultura a 30°C. Essa temperatura de incubação foi comparada à temperatura geralmente usada para o crescimento do *Lactobacillus* (37°C). Os resultados são mostrados na FIGURA 24.

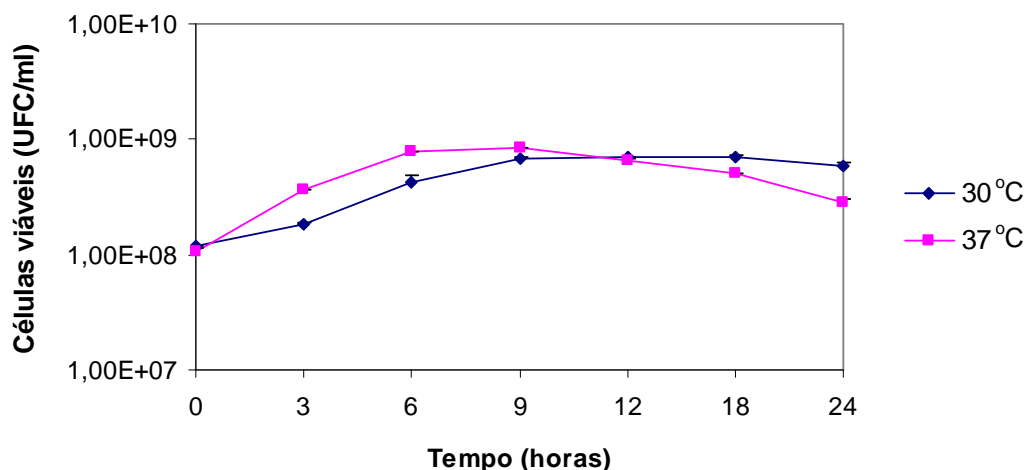


FIGURA 24 - CRESCIMENTO DO *L. agilis* LPB 56 EM CALDO DE FEIJÃO A 30 E 37°C

FONTE: O AUTOR (2008)

Pôde-se constatar que o crescimento da bactéria foi mais rápido a 37°C, chegando a $7,4 \times 10^8$ UFC/mL às 9 horas de incubação. O crescimento máximo observado a 30°C foi $5,9 \times 10^8$ UFC/mL às 18 horas.

No entanto ao final de 24 horas de incubação, observou-se uma diminuição no número de células viáveis a 37°C ($2,8 \times 10^8$ UFC/mL), apresentando um valor inferior ao encontrado para 30°C ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL). Neste período, o acúmulo de ácido láctico na fermentação a 37°C pode ter sido mais intenso, provocando inibição e morte da população bacteriana.

4.5.3 Influência do carbonato de cálcio

Carbonato de cálcio foi utilizado com a finalidade de tamponar o meio (caldo de feijão), evitando, dessa forma, a perda de viabilidade celular. A cinética de fermentação a 37°C em meio com e sem carbonato de cálcio é mostrada na FIGURA 25.

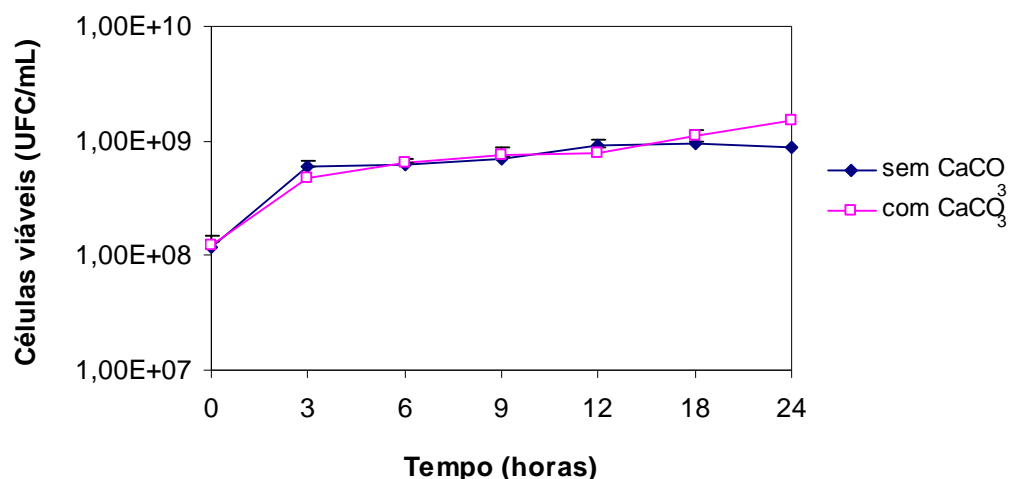


FIGURA 25 – CRESCIMENTO DO *L. agilis* LPB 56 EM CALDO DE FEIJÃO COM E SEM CARBONATO DE CÁLCIO

FONTE: O AUTOR (2008)

Até às 18 horas de fermentação, observou-se o mesmo comportamento do *L. agilis* LPB 56 em meio com e sem carbonato de cálcio, com incremento de células viáveis nesse período de $9,8 \times 10^8$ UFC/mL e $8,2 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente. Às 24 horas, no entanto, constatou-se uma maior concentração de células em meio com CaCO₃, o que representou um aumento de 1 log em relação a concentração inicial. O mesmo não foi observado para o meio sem CaCO₃ (crescimento inferior a 1 log). O efeito benéfico do CaCO₃ pôde ser confirmado pelo valor final do pH. No final da fermentação o meio sem CaCO₃ apresentou pH 4,0, sendo que, no meio com CaCO₃ o pH estava em torno de 5,0. Essa diferença no pH indicou que diferentes concentrações de ácido láctico no meio, poderiam ter ação inibitória sobre a bactéria. O uso do CaCO₃, portanto, foi importante na manutenção do pH e auxiliou no crescimento celular.

4.6 OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NO CONSUMO DA ESTAQUIOSE E RAFINOSE

Através do planejamento fatorial 2^n (BOX-BEHNKEN, 1960), avaliou-se a influência de algumas variáveis sobre o consumo da estaquiose e rafinose de caldo de feijão fermentado pelo *Lactobacillus agilis* LPB 56 ($p < 0,05$).

4.6.1 Determinação das variáveis significativas

O planejamento fatorial utilizado possibilitou o estudo dos efeitos de interação dos fatores sobre a resposta. Os fatores (ou variáveis) escolhidos foram a taxa de inoculação, uso de agitação, uso de carbonato de cálcio e temperatura de incubação. As respostas consistiram na quantificação da estaquiose consumida, ácido láctico produzido e atividade da α -galactosidase. A rafinose não foi considerada no planejamento, visto que, a quantidade residual desse açúcar, após a fermentação, foi muita baixa, apresentando valores com diferenças mínimas. As variáveis e os níveis estudados são mostrados na TABELA 8.

TABELA 8 – VARIÁVEIS E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴

	Fator	-	0	+
1	Inóculo (% v/v)	10	12,5	15
2	Agitação (rpm)	0	60	120
3	CaCO ₃ (% p/v)	0	0,5	1
4	Temperatura (°C)	30	33,5	37

4.6.1.1 Consumo da estaquiose

A influência das variáveis no consumo da estaquiose foi determinada através do planejamento fatorial 2⁴, que consistiu na realização de 16 combinações mais 3 repetições no ponto central, totalizando 19 experimentos. Os resultados das análises são mostrados na TABELA 9.

TABELA 9 – RESULTADOS DO CONSUMO DA ESTAQUIOSE

	1	2	3	4	Consumo da
Ensaio	Inóculo (%)	Agitação (rpm)	CaCO ₃ (%)	Temperatura (°C)	Estaquiose (g/L)
1	- (10)	- (0)	- (0)	- (30)	3,51
2	+ (15)	- (0)	- (0)	- (30)	3,99
3	- (10)	+ (120)	- (0)	- (30)	4,28
4	+ (15)	+ (120)	- (0)	- (30)	5,65
5	- (10)	- (0)	+ (1)	- (30)	5,98
6	+ (15)	- (0)	+ (1)	- (30)	6,60

Continua

Ensaio	1 Inóculo (%)	2 Agitação (rpm)	3 CaCO ₃ (%)	4 Temperatura (°C)	Consumo da Estaquiose (g/L)
7	- (10)	+ (120)	+ (1)	- (30)	6,37
8	+ (15)	+ (120)	+ (1)	- (30)	6,37
9	- (10)	- (0)	- (0)	+ (37)	5,76
10	+ (15)	- (0)	- (0)	+ (37)	6,42
11	- (10)	+ (120)	- (0)	+ (37)	5,31
12	+ (15)	+ (120)	- (0)	+ (37)	6,37
13	- (10)	- (0)	+ (1)	+ (37)	6,60
14	+ (15)	- (0)	+ (1)	+ (37)	6,60
15	- (10)	+ (120)	+ (1)	+ (37)	7,06
16	+ (15)	+ (120)	+ (1)	+ (37)	7,06
17	0 (12,5)	0 (60)	0 (0,5)	0 (33,5)	6,58
18	0 (12,5)	0 (60)	0 (0,5)	0 (33,5)	6,59
19	0 (12,5)	0 (60)	0 (0,5)	0 (33,5)	6,58

FONTE: O AUTOR (2008)

*NOTA: Controle = 7,06 g/L

Com o uso do planejamento fatorial verificou-se um consumo de 100% (7,06 g/L) da estaquiose presente no meio (ensaios 15 e 16 na TABELA 9), o que representou uma completa metabolização desse oligossacarídeo.

Através da análise de variância (TABELA 10) foi constatado que as variáveis que influenciaram no consumo da estaquiose foram o CaCO₃ e a temperatura com efeitos estimados em 5,12 e 3,80, respectivamente (FIGURA 26). As duas variáveis significativas explicaram 87% da variação encontrada. A taxa de inóculo e uso de agitação não foram significativas ao nível de 5%.

TABELA 10 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O CONSUMO DA ESTAQUIOSE

Fator	Soma dos Quadrados (SS)	Graus de liberdade (dF)	Médias Quadradas (MS)	Razão F (F)	Razão p (p)
(1) Inóculo	1,09459	1	1,094587	3,55906	0,095934
(2) Agitação	0,57157	1	0,571574	1,85848	0,209027
(3) CaCO ₃	8,05041	1	8,050413	26,17603	0,000911
(4) Temperatura	4,43450	1	4,434499	14,41884	0,005257
1 c/ 2	0,02822	1	0,028216	0,09174	0,769699
1 c/ 3	0,54203	1	0,542027	1,76241	0,220955
1 c/ 4	0,03596	1	0,035958	0,11692	0,741212
2 c/ 3	0,04491	1	0,044912	0,14603	0,712307
2 c/ 4	0,29292	1	0,292925	0,95245	0,357681
3 c/ 4	1,23905	1	1,239047	4,02878	0,079625
Erro	2,46039	8	0,307549		
Total SS	18,79455	18			

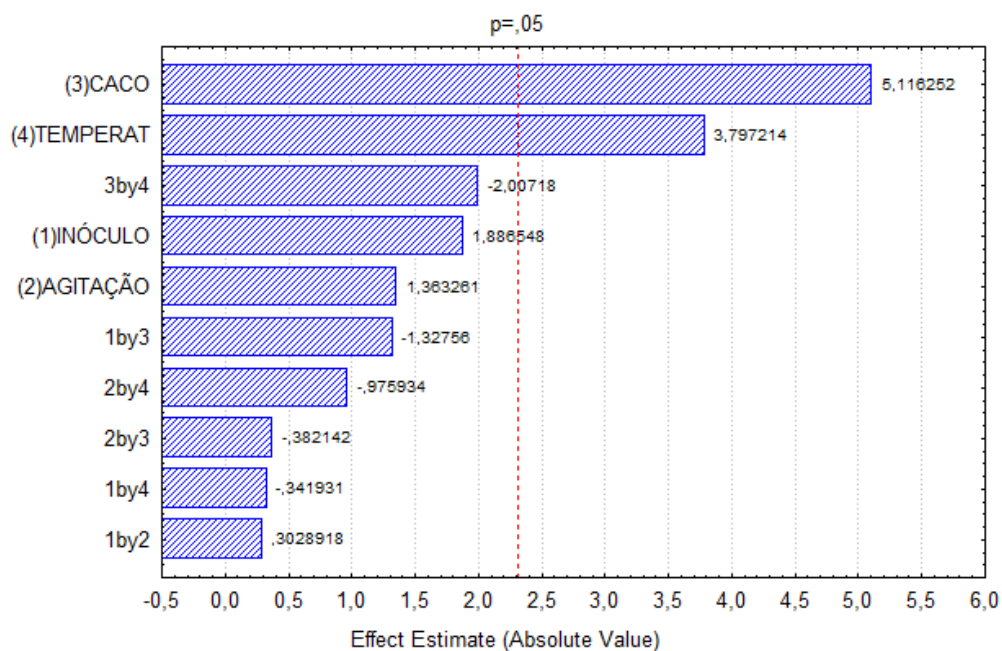
 $R^2 = 0,869091$


FIGURA 26 – SIGNIFICÂNCIA DAS VARIÁVEIS NO CONSUMO DA ESTAQUIOSE (DIAGRAMA DE PARETO)

FONTE: O AUTOR (2008)

4.6.1.2 Produção do ácido láctico

Na TABELA 11 encontram-se os valores de produção do ácido láctico segundo o planejamento fatorial utilizado.

TABELA 11 – RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO

Ensaio	1 Inóculo (%)	2 Agitação (rpm)	3 CaCO ₃ (%)	4 Temperatura (°C)	Produção de ácido láctico (g/L)
1	- (10)	- (0)	- (0)	- (30)	8,98
2	+ (15)	- (0)	- (0)	- (30)	9,66
3	- (10)	+ (120)	- (0)	- (30)	9,02
4	+ (15)	+ (120)	- (0)	- (30)	8,33
5	- (10)	- (0)	+ (1)	- (30)	12,66
6	+ (15)	- (0)	+ (1)	- (30)	13,16
7	- (10)	+ (120)	+ (1)	- (30)	9,01
8	+ (15)	+ (120)	+ (1)	- (30)	9,08
9	- (10)	- (0)	- (0)	+ (37)	11,12
10	+ (15)	- (0)	- (0)	+ (37)	12,00
11	- (10)	+ (120)	- (0)	+ (37)	10,97
12	+ (15)	+ (120)	- (0)	+ (37)	9,26
13	- (10)	- (0)	+ (1)	+ (37)	12,57
14	+ (15)	- (0)	+ (1)	+ (37)	12,68
15	- (10)	+ (120)	+ (1)	+ (37)	10,35
16	+ (15)	+ (120)	+ (1)	+ (37)	7,94
17	0 (12,5)	0 (60)	0 (0,5)	0 (33,5)	20,00
18	0 (12,5)	0 (60)	0 (0,5)	0 (33,5)	15,55
19	0 (12,5)	0 (60)	0 (0,5)	0 (33,5)	14,79

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: Controle = 0 g/L

Segundo a análise de variância nenhuma das variáveis analisadas foram significativas ao nível de 5% (FIGURA 27), não tendo influência na produção do ácido láctico. O baixo valor de R quadrado (0,27112) confirma a não correlação das variáveis estudadas na produção do ácido láctico (TABELA 12).

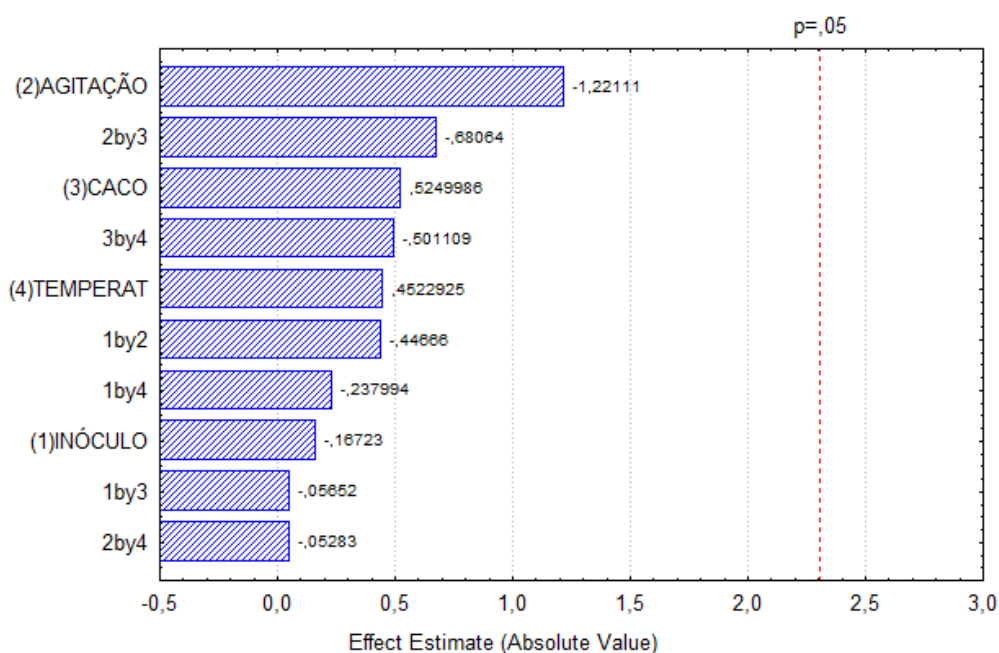


FIGURA 27 – SIGNIFICÂNCIA DAS VARIÁVEIS SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO
(DIAGRAMA DE PARETO)

FONTE: O AUTOR (2008)

TABELA 12 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PRODUÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO

Fator	Soma dos Quadrados (SS)	Graus de liberdade (dF)	Quadrado Médio (MS)	Razão F (F)	Razão p (p)
(1) Inóculo	0,4170	1	0,41699	0,027966	0,871339
(2) Agitação	22,2336	1	22,23358	1,491115	0,256807
(3) CaCO ₃	4,1097	1	4,10974	0,275624	0,613818
(4) Temperatura	3,0503	1	3,05026	0,204569	0,663071
1 c/ 2	2,9748	1	2,9748	0,199505	0,666964
1 c/ 3	0,0476	1	0,04763	0,003195	0,956313
1 c/ 4	0,8446	1	0,84456	0,056641	0,817868
2 c/ 3	6,9077	1	6,90770	0,463271	0,515312
2 c/ 4	0,0416	1	0,04162	0,002791	0,959163
3 c/ 4	3,7442	1	3,74423	0,251110	0,629790
Erro	119,2857	8	14,91071		
Total SS	163,6568	18			

$R^2 = 0,27112$

4.6.1.3 Atividade da α -galactosidase

Os valores encontrados para a atividade da α -galactosidase, segundo o planejamento fatorial 2^4 , são apresentados na TABELA 13.

TABELA 13 – RESULTADOS DA ATIVIDADE da α -GALACTOSIDASE

Ensaio	1 Inóculo (%)	2 Agitação (rpm)	3 CaCO ₃ (%)	4 Temperatura (°C)	Atividade enzimática (U/mL)
1	- (10)	- (0)	- (0)	- (30)	0,000
2	+ (15)	- (0)	- (0)	- (30)	0,000
3	- (10)	+ (120)	- (0)	- (30)	0,007
4	+ (15)	+ (120)	- (0)	- (30)	0,005
5	- (10)	- (0)	+ (1)	- (30)	0,275
6	+ (15)	- (0)	+ (1)	- (30)	0,700
7	- (10)	+ (120)	+ (1)	- (30)	0,338
8	+ (15)	+ (120)	+ (1)	- (30)	0,554
9	- (10)	- (0)	- (0)	+ (37)	0,007
10	+ (15)	- (0)	- (0)	+ (37)	0,006
11	- (10)	+ (120)	- (0)	+ (37)	0,000
12	+ (15)	+ (120)	- (0)	+ (37)	0,007
13	- (10)	- (0)	+ (1)	+ (37)	0,716
14	+ (15)	- (0)	+ (1)	+ (37)	0,843
15	- (10)	+ (120)	+ (1)	+ (37)	0,206
16	+ (15)	+ (120)	+ (1)	+ (37)	0,317
17	0 (12,5)	0 (60)	0 (0,5)	0 (33,5)	0,042
18	0 (12,5)	0 (60)	0 (0,5)	0 (33,5)	0,064
19	0 (12,5)	0 (60)	0 (0,5)	0 (33,5)	0,089

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: * Controle = 0 U/mL

O uso do CaCO₃ foi a única variável significativa para a atividade da α -galactosidase, com efeito estimado em 6,93 ao nível de 5% de significância (FIGURA 28). A variável CaCO₃ explicou 89% da variação encontrada (TABELA 14).

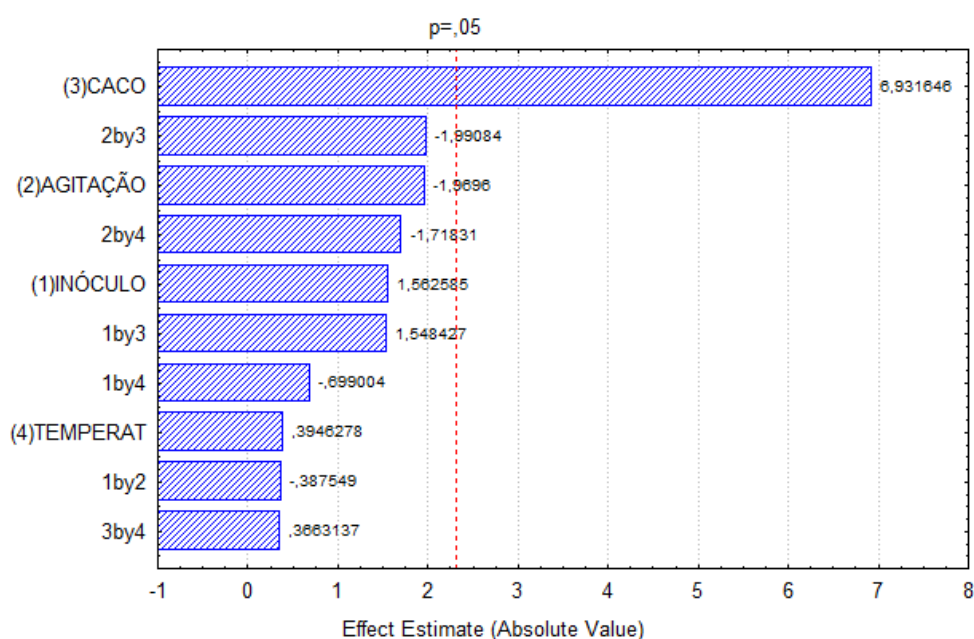


FIGURA 28 – SIGNIFICÂNCIA DAS VARIÁVEIS NA ATIVIDADE DA α -GALACTOSIDASE (DIAGRAMA DE PARETO)

FONTE: O AUTOR (2008)

TABELA 14 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ATIVIDADE DA α -GALACTOSIDASE

Fator	Soma dos Quadrados (SS)	Graus de liberdade (dF)	Quadrado Médio (MS)	Razão F (F)	Razão p (p)
(1) Inóculo	0,048731	1	0,048731	2,44167	0,156777
(2) Agitação	0,077423	1	0,077423	3,87932	0,084396
(3) CaCO ₃	0,958931	1	0,958931	48,04772	0,000121
(4) Temperatura	0,003108	1	0,003108	0,15573	0,703430
1 c/ 2	0,002998	1	0,002998	0,15019	0,708457
1 c/ 3	0,047852	1	0,047852	2,39763	0,160111
1 c/ 4	0,009752	1	0,009752	0,48861	0,504361
2 c/ 3	0,079102	1	0,079102	3,96343	0,081667
2 c/ 4	0,058928	1	0,058928	2,95260	0,124063
3 c/ 4	0,002678	1	0,002678	0,13419	0,723629
Erro	0,159663	8	0,19958		
Total SS	1,449163	18			

$$R^2 = 0,88982$$

A influência do CaCO_3 na atividade da α -galactosidase poderia estar relacionada a uma ação tamponante do meio de fermentação pelo uso desse agente, evitando dessa forma, uma excessiva acidificação, que poderia levar a desnaturação da enzima e perda da atividade biológica.

4.6.2 Otimização das variáveis

De acordo com os resultados do primeiro planejamento fatorial, as variáveis significativas no consumo da estaquiose foram temperatura e uso do CaCO_3 . Baseado nessas informações, essas duas variáveis foram usadas em um segundo planejamento fatorial 2^2 (com 2 pontos axiais e 3 repetições no ponto central), que teve por objetivo otimizar os efeitos dos fatores (variáveis) sobre o consumo da estaquiose. Apenas os resultados do consumo da estaquiose são mostrados a seguir, visto que, as variáveis e os níveis usados não foram significativos na produção do ácido láctico e na atividade da α -galactosidase ($p > 0,05$).

4.6.2.1 Consumo da estaquiose

As variáveis e níveis usados no planejamento fatorial 2^2 estão na TABELA 15 e os resultados dos 11 ensaios são mostrados na TABELA 16.

TABELA 15 – VARIÁVEIS E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2

Fator	-1,41	-1	0	+1	+1,41
CaCO_3 (% p/v)	0,4	0,6	1	1,4	1,6
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	32	34	37	40	42

TABELA 16 - RESULTADOS DE CONSUMO DA ESTAQUIOSE

Ensaio	T	C	Consumo da Estaquiose (g/L)
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	CaCO_3 (%)	
1	-1 (34)	-1 (0,6)	8,81
2	+1 (40)	-1 (0,6)	8,31
3	-1 (34)	+1 (1,4)	8,60
4	+1 (40)	+1 (1,4)	9,02
5	-1,41 (32)	0 (1)	6,48

Continua

Ensaio	T Temperatura (°C)	C CaCO ₃ (%)	Consumo da Estaquiose (g/L)
6	+1,41 (42)	0 (1)	8,96
7	0 (37)	-1,41 (0,4)	9,08
8	0 (37)	+1,41 (1,6)	9,04
9	0 (37)	0 (1)	9,03
10	0 (37)	0 (1)	9,02
11	0 (37)	0 (1)	9,00

FONTE: O AUTOR (2008)

* Controle = 12,27 g/L

A variável temperatura foi significativa ao nível de 5% com efeito estimado em 2,76 (FIGURA 29). Essa variável explicou 76% da variação encontrada. O CaCO₃ e a interação entre as duas variáveis não foram significativos (TABELA 17).

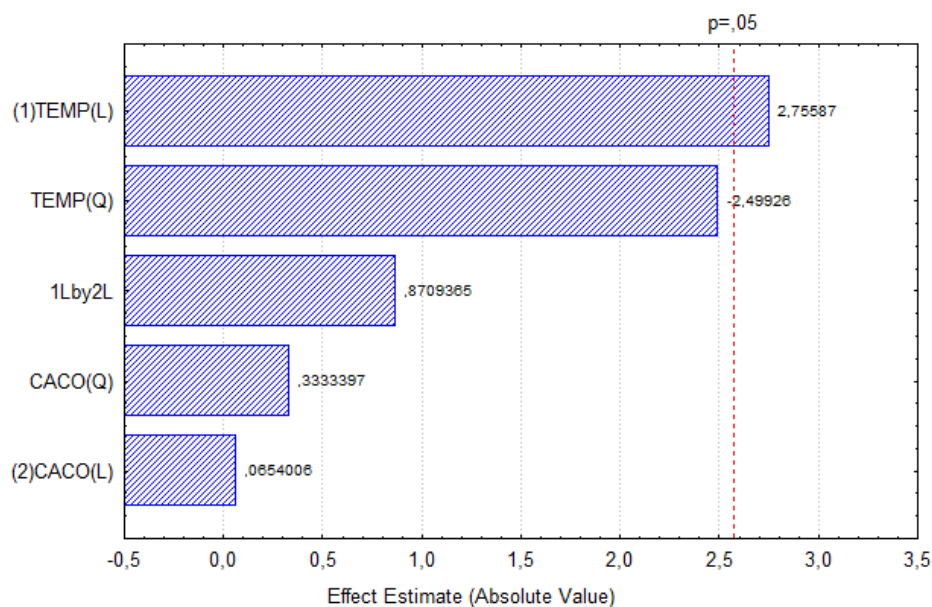


FIGURA 29 – SIGNIFICÂNCIA DA TEMPERATURA E CARBONATO DE CÁLCIO NO CONSUMO DA ESTAQUIOSE (DIAGRAMA DE PARETO)

FONTE: O AUTOR (2008)

TABELA 17 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O CONSUMO DA ESTAQUIOSE

Fator	Soma dos Quadrados (SS)	Graus de liberdade (dF)	Quadrado Médio (MS)	Razão F (F)	Razão p (p)
(1)Temperatura (L)	2,112856	1	2,112856	7,594821	0,040030
Temperatura (Q)	1,737697	1	1,737697	6,246282	0,054540
(2) CaCO ₃ (L)	0,001190	1	0,001190	0,004277	0,950389
CaCO ₃ (Q)	0,030912	1	0,030912	0,111115	0,752402
1L c/ 2L	0,211021	1	0,211021	0,758530	0,423625
Erro	1,390985	5	0,278197		
Total SS	5,801385	10			

$$R^2 = 0,76023$$

De acordo com a TABELA 18, pôde-se observar que não houve correlação entre as variáveis temperatura e CaCO₃ dentro dos níveis estudados, e que os maiores consumos de estaquiose são obtidos a temperaturas em nível superior.

TABELA 18 – CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NO CONSUMO DA ESTAQUIOSE

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Teste T	Valor p
(1)Temperatura (L)	0,513913	0,186480	2,75587	0,040030
Temperatura (Q)	-0,554723	0,221955	-2,49926	0,054540
(2) CaCO ₃ (L)	0,012196	0,186480	0,06540	0,950389
CaCO ₃ (Q)	0,073986	0,221955	0,33334	0,752402
1L c/ 2L	0,229685	0,263722	0,87094	0,423625

Quando o maior nível de temperatura (37°C) do primeiro planejamento foi utilizado como ponto médio para o segundo planejamento, observaram-se os melhores resultados para o consumo da estaquiose (FIGURA 30).

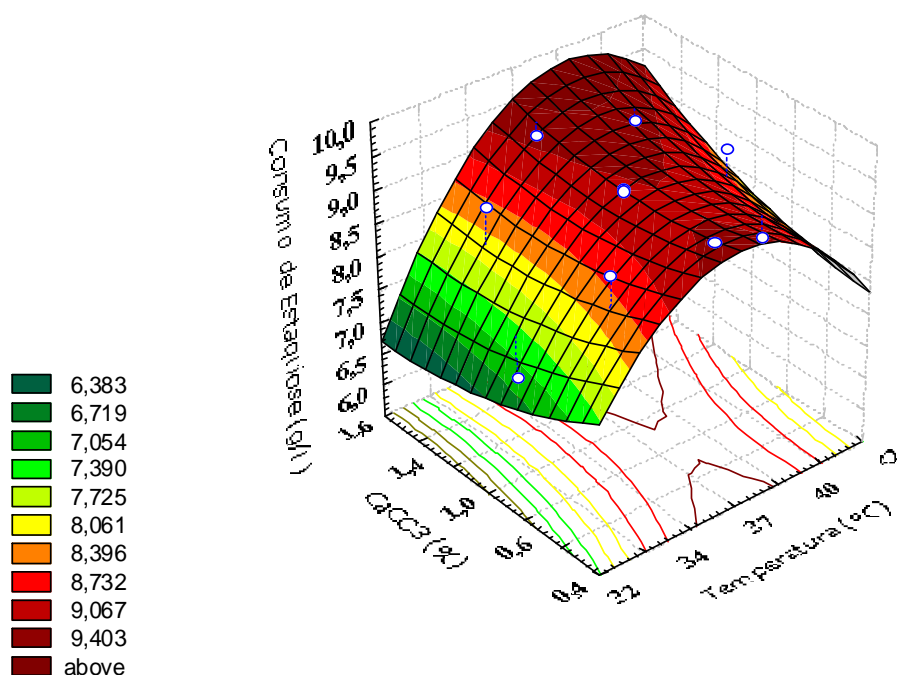


FIGURA 30 – OTIMIZAÇÃO DO CONSUMO DA ESTAQUIOSE (METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA)

O modelo estatístico utilizado foi representado pela seguinte equação:

$$Z = 9,016430 + (0,51391340300479 \times T) - (0,55472253776041 \times T^2)$$

Onde:

Z = consumo de estaquiase (g/L)

T= temperatura (°C)

O uso da equação acima indica que uma temperatura de 37°C possibilitaria um consumo de 9,13 g/L de estaquiase presente inicialmente no caldo de feijão.

Considerando que, o CaCO_3 não foi significativo ($p > 0,05$) nas condições de estudo estabelecidas e que seria necessária a adição de 1% dessa substância para a neutralização do ácido láctico produzido, foi estabelecida uma quantidade de 1% de CaCO_3 a ser usada nas fermentações. A temperatura estabelecida foi a de 37°C, conforme os resultados do planejamento estatístico, que demonstraram uma satisfatória redução do teor de estaquiase do caldo de feijão nesta temperatura.

4.7 FERMENTAÇÕES OTIMIZADAS DO CALDO DE FEIJÃO

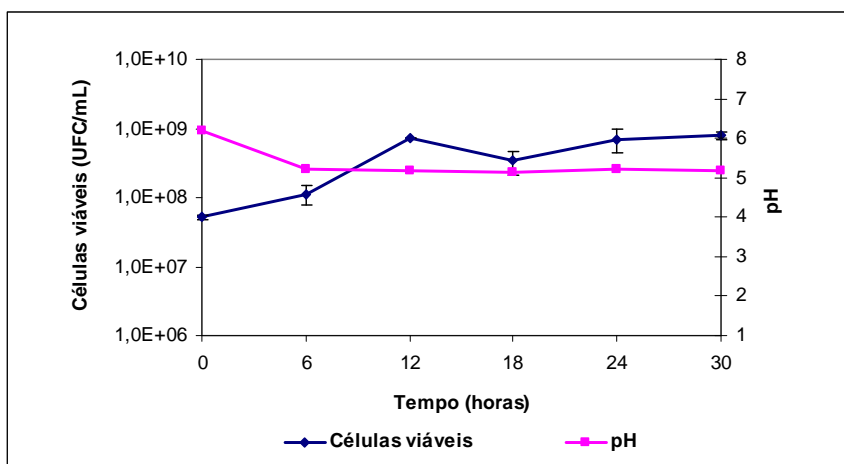
Foram realizadas fermentações do caldo de feijão em frascos (300 mL) e em biorreator (6L), respectivamente. As condições estabelecidas para o cultivo do *Lactobacillus agilis* LPB 56 foram 10% (v/v) de inóculo, pH ajustado a 6,5 com solução NaOH 2,5N, adição de 1% (p/v) de CaCO_3 e temperatura de incubação de 37°C. Foi necessária uma agitação de 160 rpm para a dissolução e homogeneização do CaCO_3 no caldo de feijão. Amostras foram retiradas a cada 6 horas durante 30 horas de fermentação, sendo analisados parâmetros como crescimento celular (contagem de células viáveis), pH, quantificação da estaquiose, rafinose e ácido láctico por HPLC e determinação da atividade da α -galactosidase.

4.7.1 Crescimento em frascos e biorreator

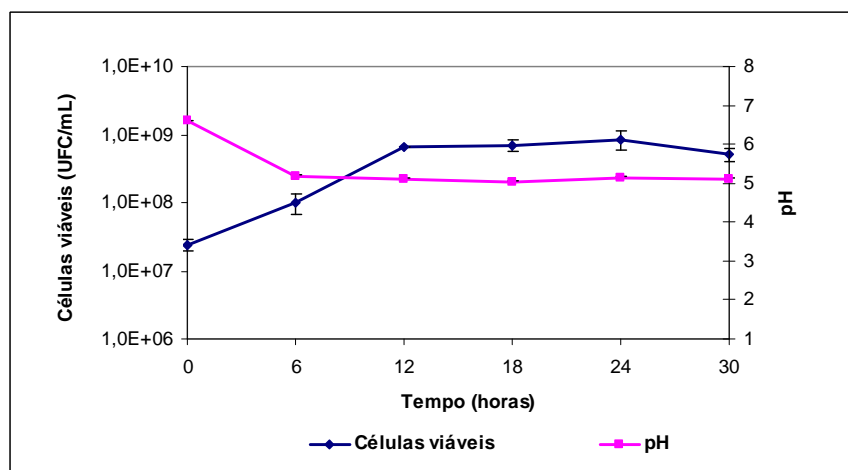
A cinética de crescimento do *L. agilis* LPB 56 e a variação do pH do caldo de feijão durante o processo fermentativo são mostrados na FIGURA 31.

Foi verificado um comportamento semelhante do *Lactobacillus agilis* LPB 56 quando crescido em frascos (erlenmeyers) e biorreator. Através dos gráficos (FIGURA 31) pôde-se observar que a fase de crescimento exponencial foi alcançada às 12 horas de incubação tanto para o crescimento em frascos como em biorreator. Possivelmente, o crescimento celular em biorreator foi mais rápido que em erlenmeyers. O maior número de células viáveis foi observado somente às 30 horas ($7,9 \times 10^8$ UFC/mL) em erlenmeyers, sendo que, em biorreator a concentração de células viáveis foi máxima às 24 horas ($8,6 \times 10^8$ UFC/mL), o que poderia ser justificado pelas diferentes condições do biorreator, resultando em diferentes velocidades de crescimento.

Em ambas as condições, houve um decréscimo no valor do pH nas primeiras 6 horas, com valores que variaram de aproximadamente 6,6-6,2 a 5,1, mantendo este valor até às 30 horas de fermentação. A diminuição do pH do meio deve-se a produtos do metabolismo dos açúcares presentes no feijão, como o ácido láctico, e a estabilização do pH pode estar associada a presença do carbonato de cálcio que ajuda a manter a concentração de ácido láctico, exercendo, portanto, ação tamponante sobre o caldo de feijão fermentado.



(a)



(b)

FIGURA 31 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR E VARIAÇÃO DO PH: a) FRASCOS, b) BIORREATOR

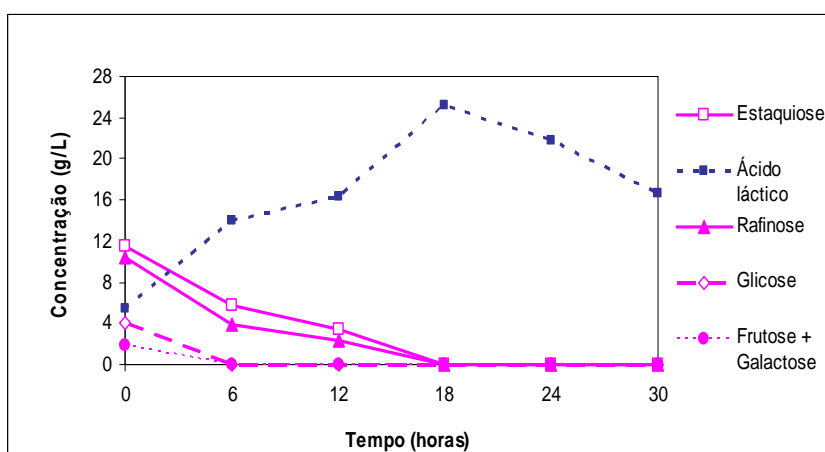
FONTE: O AUTOR (2008)

4.7.2 Análise dos açúcares e do ácido láctico

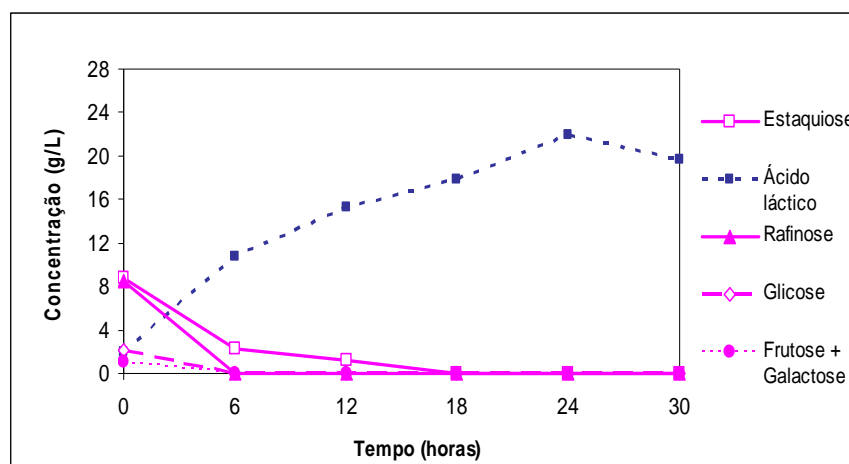
A quantificação de açúcares (glicose e frutose + galactose), oligossacarídeos da Família Rafinose (estaquiase e rafinose) e do ácido láctico foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). De acordo com os gráficos (FIGURA 31), foram detectados conteúdos iniciais de estaquiase ($11,47 \pm 0,5$ g/L), rafinose ($10,38 \pm 0,9$ g/L), glicose ($3,98 \pm 0,5$ g/L) e galactose + frutose ($1,92 \pm 0,4$ g/L) em frascos. No biorreator, os açúcares detectados foram a

estaquiose ($8,80 \pm 0,5$ g/L) e rafinose ($8,49 \pm 0,9$ g/L), glicose ($2,14 \pm 0,5$ g/L) e galactose + frutose ($1,13 \pm 0,4$ g/L).

Na fermentação em frascos (FIGURA 32a) estaquiose e rafinose foram 100% consumidas após 12 horas de incubação. Glicose e frutose + galactose foram completamente consumidas nas primeiras 6 horas. A máxima produção do ácido láctico ocorreu às 18 horas ($19,77 \pm 0,01$ g/L) com redução do valor após esse período.



(a)



(b)

FIGURA 32 – VARIAÇÃO NO TEOR DE AÇÚCARES E ÁCIDO LÁCTICO DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DO CALDO DE FEIJÃO: a) FRASCOS, b) BIORREATOR

FONTE: O AUTOR (2008)

Já na fermentação em biorreator (FIGURA 32b) rafinose, glicose e frutose + galactose foram completamente consumidas após 6 horas de incubação. A estaquiose foi 100% consumida somente após 12 horas. A metabolização dos

açúcares levou a uma produção de ácido láctico de $19,92 \pm 0,01$ g/L às 24 horas de incubação, com leve redução ($2,22 \pm 0,01$ g/L) às 30 horas. A produção do ácido láctico poderia estar também associada a outros compostos não quantificados neste estudo, já que, às 12 horas de incubação os açúcares analisados já haviam sido completamente consumidos. A diminuição da concentração do ácido láctico às 24 horas poderia ser justificada pelo consumo pelo próprio *L. agilis* LPB 56.

As diferenças encontradas nos tempos de consumo ressaltam a importância da fermentação em biorreatores, já que, dessa forma, o microrganismo se desenvolve melhor, tornando o processo mais rápido, e com um volume de produto maior.

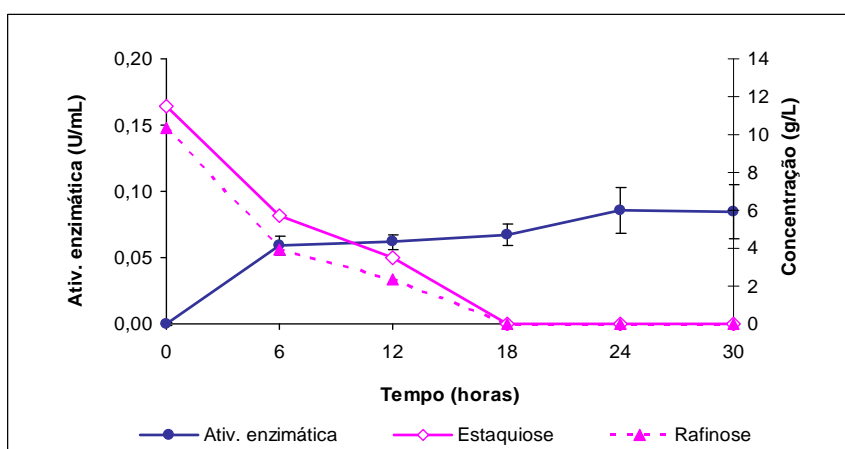
Os resultados deste trabalho são superiores aos encontrados por Wang *et al.* (2003) onde o *S. thermophilus* CCRC 14085, cultivado em leite de soja junto com *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633, reduziram os níveis de estaquiose e rafinose em 58,1% e 39,4%, respectivamente, após 24 horas de fermentação a 37°C.

Resultados similares ao deste estudo foram encontrados por Karp (2007), onde a fermentação de vinhaça de soja com o *L. agilis* LPB 56 reduziu em 100% os níveis de rafinose e aproximadamente 85% os níveis de estaquiose em 48 horas de fermentação a 30°C. A redução não foi de 100% visto que a concentração inicial dos açúcares era maior (rafinose = 19g/L; estaquiose = 50g/L) e que o objetivo do trabalho era a produção de ácido láctico.

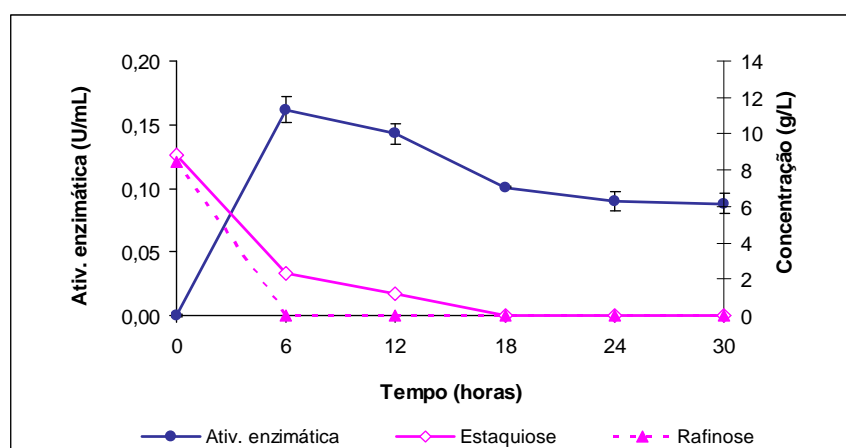
Diversos trabalhos avaliaram o crescimento de bactérias lácticas em leite de soja, o qual contém quantidades substanciais dos açúcares estaquiose e rafinose. Mital, Steinkraus e Naylor (1974) relataram que microrganismos como o *Streptococcus thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. cellobiosis* e *L. plantarum* exibiram significativo crescimento e produção de ácido em leite de soja. Nos estudos de Donkor *et al.* (2007) *S. thermophilus* St1342, *L. acidophilus* La4962 e *B. lactis* B94 reduziram os níveis de rafinose em leite de soja significativamente ($P < 0,05$) em 64,5%; 55,9% e 77,4%, respectivamente. Hou, Yu e Chou (2000) observaram uma redução nos teores de estaquiose em leite de soja de $5,88 \text{ mmol.L}^{-1}$ para 2,07 e 2,90 mmol.L^{-1} (equivalente a uma redução de 64,8% e 50,7%) por *B. infantis* CCRC 14633 e *B. longum* B6, respectivamente. Nos estudos de Scalabrini *et al.* (1998) *B. breve* MB233, *B. infantis* MB258 e *B. longum* MB300 consumiram 100% da rafinose e 68, 73 e 35% da estaquiose em leite de soja, respectivamente.

4.7.3 Determinação da atividade da α -galactosidase

Na fermentação em frascos (FIGURA 33a) a atividade máxima da α -galactosidase foi alcançada às 24 horas de fermentação ($0,086 \pm 0,02$ U/mL). A atividade da α -galactosidase é decorrente da quebra das ligações α -1,6 dos oligossacarídeos, o que pode ser confirmado pela redução da estaquiose e rafinose até às 18 horas. A estabilização da atividade pode ser devido a presença de outros oligossacarídeos não analisados.



(a)



(b)

FIGURA 33 – ATIVIDADE DA α -GALACTOSIDASE E TEOR DE OLIGOSSACARÍDEOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO: a) FRASCOS, b) BIORREATOR

FONTE: O AUTOR (2008)

Na fermentação em biorreator foi verificada uma atividade mais intensa da enzima às 6 horas ($0,162 \pm 0,01$ U/mL) (FIGURA 33b), onde foi constatada também a completa redução da rafinose e grande parte da estaquiose (74%). Após esse período, a α -galactosidase foi perdendo a sua atividade, chegando a $0,088 \pm 0,01$ U/mL às 30 horas de fermentação. A redução e estabilização da atividade enzimática podem ter ocorrido devido a presença de proteases ou ausência de substratos indutores no caldo de feijão.

A diminuição da atividade enzimática na fase estacionária de crescimento (12 horas) do *L. agilis* LPB 56 pode ser apoiada por Roy, Chevalier e Savoie (1991), onde bactérias lácticas do gênero *Bifidobacterium* tiveram um decréscimo na atividade enzimática durante a fase estacionária. Donkor *et al.* (2007) avaliaram a atividade da α -galactosidase, em meio MRS modificado com rafinose (2%) e constataram uma redução dessa atividade após a fase log de crescimento.

Gdala *et al.* (1997) associaram a redução nos teores de estaquiose a atividade da α -galactosidase. Nesse estudo, porcos foram alimentados com uma dieta suplementada com a α -galactosidase e demonstraram uma digestibilidade da rafinose, estaquiose e verbascose de até 97%. Quando a enzima não foi suplementada, apenas 80% dos galactosídeos de sementes de *Lupinus luteus* L. foram digeridos.

Tsangalis e Shah (2004) avaliaram a redução da estaquiose e rafinose em leite de soja por 4 cepas de *Bifidobacterium* e verificaram que duas delas (*B. longum* BB536 e *B. pseudolongum* BP 20099) apresentaram altos valores de atividade da α -galactosidase. Estas bactérias foram capazes de metabolizar altas concentrações de estaquiose e rafinose, sendo que, esses açúcares não foram detectados em leite de soja (suplementado com D-glicose e L-cisteína) após 48 horas de fermentação por *B. longum* BB536.

4.8 SECAGEM DO CALDO DE FEIJÃO FERMENTADO

A secagem do caldo fermentado foi realizada com a finalidade de aumentar a estabilidade do produto, eliminando a carga microbiana presente após o processo fermentativo. O processo de secagem foi feito em estufas convencionais (sem circulação de ar) e estufa a vácuo (FIGURA 34). Os caldos de feijão (Peso = 800 g)

foram acondicionados em bandejas plásticas (26,5 cm x 19 cm x 6 cm) e secados a 60, 80 e 100°C. A aparência do pó de feijão fermentado é mostrada na FIGURA 35.



FIGURA 34 – ESTUFA A VÁCUO (VACUCELL 22,55 1M)



FIGURA 35 – PÓ DE FEIJÃO FERMENTADO

Antes que as partículas secassem completamente, estas foram passadas em peneiras de 2 mm de diâmetro (ou 10 *mesh*). Esta etapa proporcionou uma melhor aparência ao produto, já que, durante a secagem ocorreu a formação de grumos de diferentes tamanhos. Além disso, o aumento da superfície de contato das partículas menores, resultou na maior efetividade da secagem, evitando inconvenientes como a desidratação parcial no interior das partículas.

A perda da umidade foi monitorada em balança determinadora de umidade por infravermelho (FIGURA 36), submetendo as amostras a secagem a 105°C. O teor de umidade final estabelecido foi de 2 a 4%, conforme o recomendado por Jay (2005) para a secagem de vegetais.



FIGURA 36 – BALANÇA DETERMINADORA DE UMIDADE POR INFRAVERMELHO (TOP RAY)

Constatou-se que o uso das temperaturas de 100 e 80°C despenderam o mesmo tempo para a secagem do caldo (19 horas) (FIGURA 37). A queda mais acentuada da umidade ocorreu entre 16 e 18 horas, com 38,3% e 40,2% de redução do teor de umidade para 100°C e 80°C, respectivamente, neste intervalo de tempo.

As secagens realizadas em estufa convencional e a vácuo a 60°C despenderam 23 horas e apresentaram diferenças mínimas no conteúdo de umidade das partículas secas (pó). A maior perda de umidade foi verificada ao final de secagem, entre 19 e 21 horas, com valores de umidade que variaram de 47,3% a 10,8% na estufa convencional e, de 35,2% a 9,8% na estufa a vácuo.

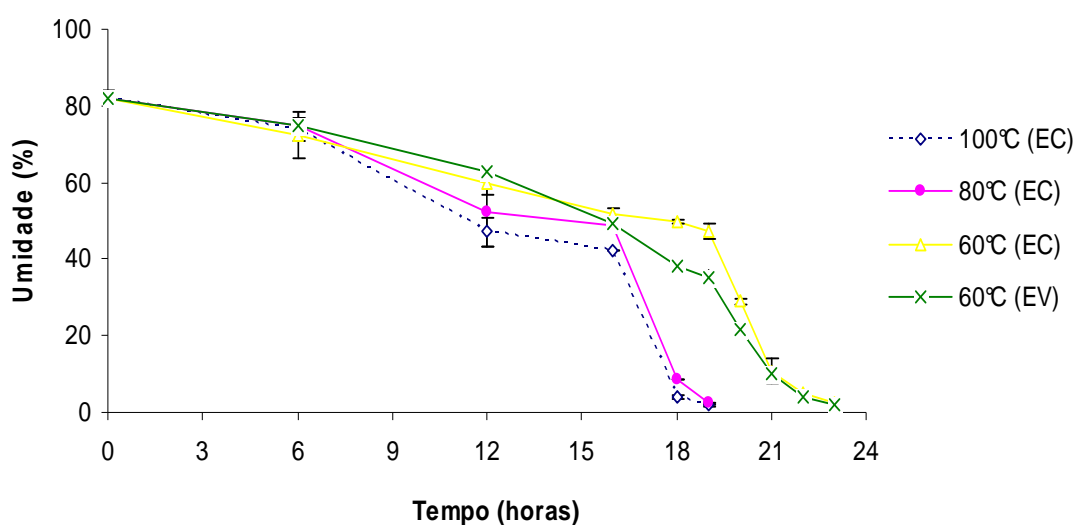


FIGURA 37 – VARIAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM EM ESTUFA CONVENCIONAL (EC) E ESTUFA A VÁCUO (EV)

FONTE: O AUTOR (2008)

A secagem a 100°C reduziu drasticamente o conteúdo de umidade a 1,86%, o que resultou em partículas com certo grau de dureza. Segundo Ordóñez *et al.* (2005) quando a secagem inicial é muito rápida pode ocorrer o endurecimento superficial das partículas. O vapor d'água é eliminado muito mais rapidamente da superfície do produto do que do centro, resultando em forte retração da camada superficial, com formação de uma película dura e impermeável.

As temperaturas de 80 e 60°C resultaram em pós com teores de umidade em torno de 2,0-2,5%. Os valores de umidade e atividade de água (A_w) do feijão seco são mostrados na TABELA 19.

TABELA 19 – TEOR DE UMIDADE E ATIVIDADE DE ÁGUA DO CALDO DE FEIJÃO DESIDRATADO

Temperatura	Umidade (%)	Atividade de água (A_w)
100°C (EC)	1,86 ± 0,11	0,073 ± 0,02
80°C (EC)	2,30 ± 0,01	0,075 ± 0,01
60°C (EC)	2,48 ± 0,32	0,063 ± 0,01
60°C (EV)	2,00 ± 0,13	0,067 ± 0,01

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: * EC= estufa convencional, EV = estufa a vácuo

As metodologias empregadas na secagem do caldo resultaram em pós com teores de umidade e valores de atividade de água (A_w) relativamente baixos, que inibiriam o crescimento de microrganismos patogênicos. No entanto, tais características poderiam influenciar a capacidade de rehidratação das partículas.

O uso da estufa a vácuo demonstrou ser um método não econômico, pois utilizou o mesmo tempo da estufa convencional. Isso pode ter ocorrido devido a saturação do ar atmosférico, ocasionada pelo alto teor de umidade inicial do caldo. No entanto, a secagem em sistema a vácuo ainda é uma alternativa a ser estudada, já que, preserva a qualidade nutricional do alimento. Contudo, para que esse método seja utilizado é necessária a remoção de uma grande quantidade de água no caldo. A viabilidade econômica do processo deve ser bem avaliada, visto que, o uso de sistema a vácuo é geralmente considerado dispendioso.

4.8.1 Uso da centrifugação

A fim de reduzir a quantidade inicial de água no caldo e diminuir o tempo de desidratação incluiu-se a etapa de centrifugação antes da secagem. O caldo de feijão fermentado foi centrifugado a 4700 rpm por 15 minutos e 800 gramas do sedimento foram passados em peneira de 2 mm (ou 10 *mesh*) de diâmetro e colocados em bandejas plásticas. A secagem foi realizada a 80°C, já que nesta temperatura o tempo de desidratação foi menor, com efeitos similares ao produto seco a 60°C.

De acordo com o gráfico (FIGURA 38) pôde-se observar que a desidratação precedida da etapa de centrifugação reduziu o tempo de secagem do caldo em 3 horas. O caldo não centrifugado apresentou ao final das 19 horas de secagem um teor de umidade de 2,30% ($A_w = 0,075 \pm 0,01$), enquanto que, o caldo centrifugado apresentou um teor de 3,58% ($A_w = 0,141 \pm 0,01$) em 16 horas.

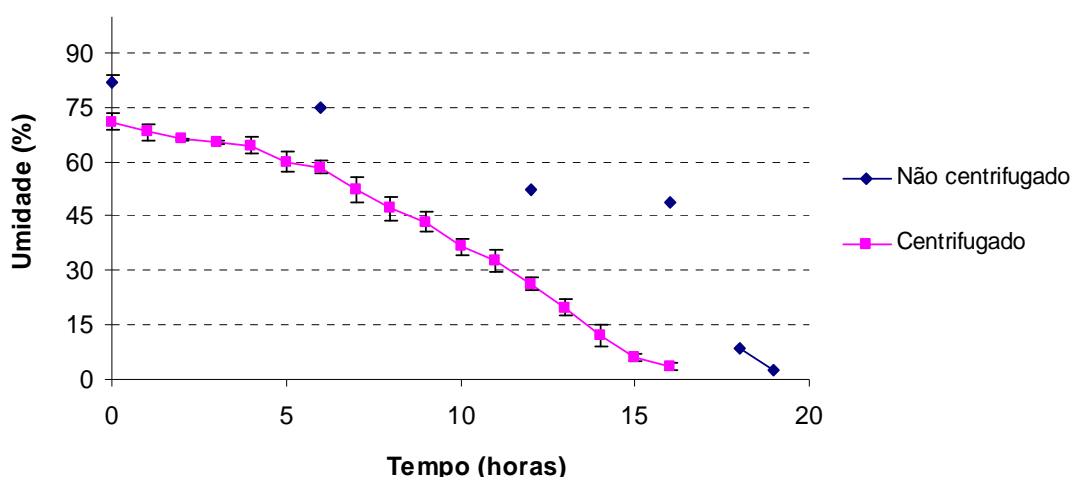


FIGURA 38 – CURVA DE SECAGEM DO CALDO DE FEIJÃO CENTRIFUGADO E NÃO CENTRIFUGADO

FONTE: O AUTOR (2008)

Verificou-se uma redução na curva quando a centrifugação foi incluída no processo de secagem, mostrando uma diminuição nos tempos de desidratação. No tempo de secagem de 16 horas, o teor de umidade do caldo centrifugado ($3,58 \pm 0,30\%$) foi significativamente inferior ao do caldo não centrifugado ($49,0 \pm 0,11\%$).

Maiores quantidades de caldo de feijão poderiam revelar maiores diferenças entre as duas curvas de secagem (com ou sem centrifugação).

4.9 ANÁLISES FÍSICAS

Os pós de feijão fermentado, desidratados em estufa convencional (60, 80 e 100°C) e a vácuo (60°C) foram analisados quanto a capacidade de rehidratação. Os critérios avaliados foram a solubilidade e a capacidade de intumescimento das partículas secas.

4.9.1 Solubilidade

A medida da solubilidade é usada para avaliar a capacidade do pó de manter-se em uma mistura homogênea com a água (estável) e freqüentemente não constitui uma solução, e sim uma emulsão e/ou suspensão. O aumento da solubilidade é comumente referido, então, como "solubilização" (VISSOTTO *et al.*, 2006).

A solubilidade foi determinada pela hidratação das partículas secas em água. Após a hidratação, centrifugou-se a mistura e os sólidos secos, recuperados do sobrenadante, foram quantificados (TABELA 20).

TABELA 20 – SOLUBILIDADE DAS PARTÍCULAS SECAS DE FEIJÃO

Temperatura	100°C (EC)	80°C (EC)	60°C (EC)	60°C (E V)
Solubilidade (%)	21,58 ^a ± 0,1	20,45 ^a ± 0,2	21,68 ^a ± 0,2	21,21 ^a ± 0,8

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: * EC= estufa convencional, EV = estufa a vácuo

Os pós reidratados apresentaram padrões de solubilidade que não diferiram significativamente ($p > 0,05$), o que indicou que as metodologias de secagem empregadas influenciaram da mesma forma a capacidade das partículas de se manterem em uma mistura homogênea (solubilidade).

Os valores de solubilidade encontrados por Shimelis, Meaza e Rakshit (2006) para farelos de três variedades de feijões melhorados (*Phaseolus vulgaris* L.)

– Roba (33,5%), Awash (37%) e Beshbesh (37,8%) – foram superiores aos valores encontrados neste estudo. A exposição a altas temperaturas pode ter alterado a estrutura química do feijão, prejudicando a sua capacidade de se ligar com a água.

4.9.2 Capacidade de intumescimento

A capacidade de intumescimento das partículas foi determinada pela quantidade de água absorvida pelo amido, contido no grão. Os resultados foram calculados pela razão entre o peso dos grânulos inchados centrifugados e o peso da matéria seca de feijão. Os valores obtidos estão na TABELA 21.

TABELA 21 – CAPACIDADE DE INTUMESCIMENTO DAS PARTÍCULAS SECAS DE FEIJÃO

Temperatura	100°C (EC)	80°C (EC)	60°C (EC)	60°C (EV)
Capacidade de intumescimento (%)	0,97 ^a ± 0,0	0,98 ^a ± 0,0	0,98 ^a ± 0,0	0,95 ^a ± 0,0

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: * EC= estufa convencional, EV = estufa a vácuo

As partículas secas do feijão fermentado apresentaram a mesma capacidade de inchamento ($p > 0,05$), demonstrando que as metodologias empregadas para a secagem dos caldos tiveram efeitos similares.

Valores encontrados por Shimelis, Meaza e Rakshit (2006) para as variedades de feijão melhorado Roba, Awash e Beshbesh foram superiores ao deste trabalho (9,17%, 10,66% e 11,27%, respectivamente), demonstrando que o processo empregado para a produção do pó de feijão fermentado reduziu fortemente a capacidade de hidratação das partículas.

4.9.3 Determinação da viscosidade após a rehidratação

Foram realizados ensaios para a rehidratação do pó de feijão secado a temperatura de 80°C. As metodologias para a rehidratação do pó são mostradas a seguir:

A5 → dissolução em água em ebulição e fervura ($\pm 98^{\circ}\text{C}$) por 5 minutos

A10 → dissolução em água em ebulição e fervura ($\pm 98^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos

B5 → hidratação em água fria ($\pm 15^{\circ}\text{C}$) por 5 minutos e fervura ($\pm 98^{\circ}\text{C}$) por 5 minutos

B10 → hidratação em água fria ($\pm 15^{\circ}\text{C}$) por 5 minutos e fervura ($\pm 98^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos

C5 → dissolução em água fria ($\pm 15^{\circ}\text{C}$) e fervura ($\pm 98^{\circ}\text{C}$) por 5 minutos

C10 → dissolução em água fria ($\pm 15^{\circ}\text{C}$) e fervura ($\pm 98^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos

O aspecto dos caldos de feijão rehidratados é mostrado na FIGURA 39.

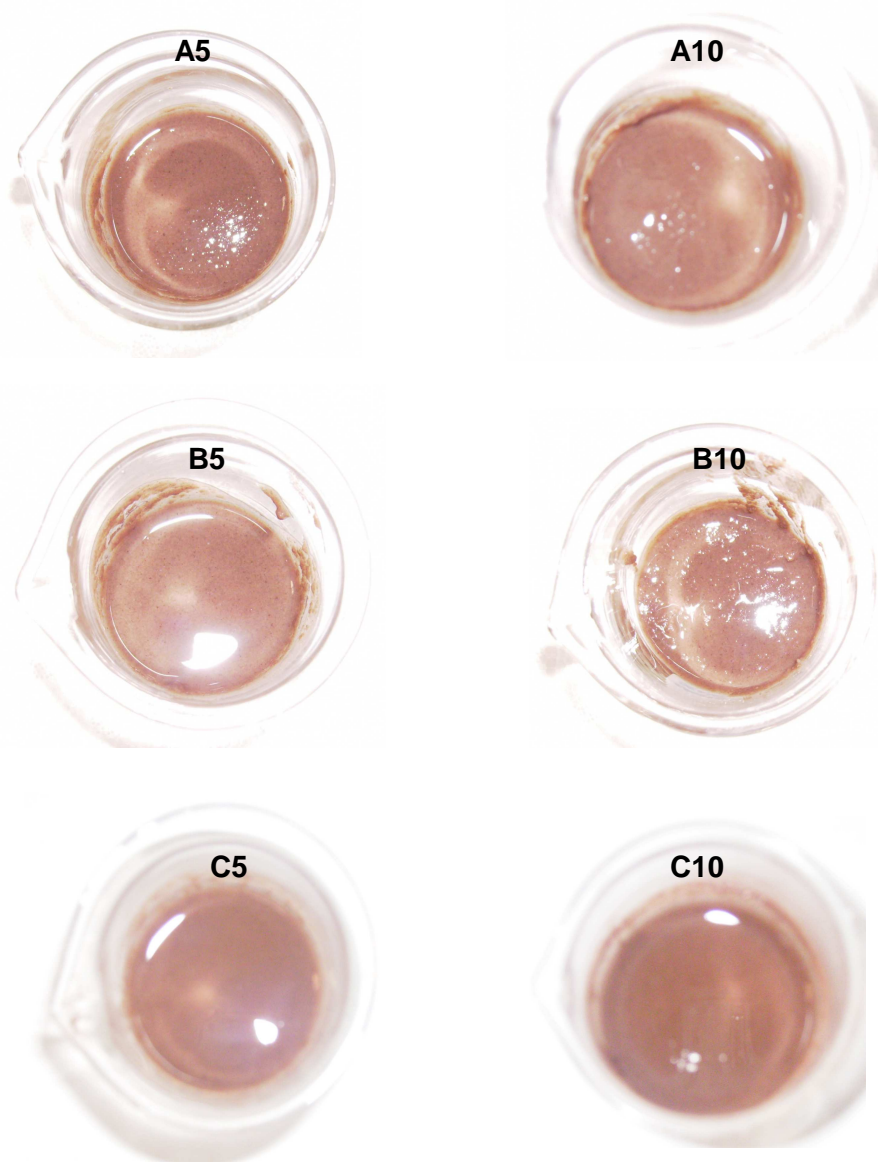


FIGURA 39 – ASPECTO DO PÓ DE FEIJÃO FERMENTADO E REHIDRATADO

A viscosidade das amostras foi determinada em viscosímetro (BROOKFIELD DV-II + PRO) usando o spindle 30, com leituras feitas em rotação de 10 e 20 rpm por aproximadamente 30 segundos (tempo médio de estabilização), os resultados expressos em *centipoise* (cP) e comparados a uma amostra de caldo de feijão não fermentado (controle), como mostra a TABELA 22.

TABELA 22 – VISCOSIDADE DAS AMOSTRAS DE FEIJÃO REHIDRATADO

Amostras	Rotação do Spindle	
	Leitura em 10 rpm (cP)	Leitura em 20 rpm (cP)
Controle	220^{cde} ± 57	165^{cd} ± 64
A5	414 ^{bc} ± 47	273 ^{bc} ± 27
A10	662 ^a ± 87	429 ^a ± 57
B5	160 ^e ± 35	116 ^d ± 23
B10	523 ^{ab} ± 25	340 ^{ab} ± 14
C5	198 ^{de} ± 60	139 ^{cd} ± 41
C10	365 ^{bcd} ± 14	240 ^{bcd} ± 07

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: * Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p > 0,01$)

A análise dos resultados mostrou que apenas as amostras A10 e B10 diferiram significativamente da amostra controle ao nível de 1%. Essas amostras não diferiram entre si ($p > 0,01$) e apresentaram os maiores valores de viscosidade, demonstrando que, um maior tempo de exposição a alta temperatura, pode ter auxiliado na obtenção de caldos mais viscosos.

Analisando cada tratamento isoladamente pôde-se concluir que a prévia hidratação das partículas secas não teve efeito sobre o aumento da viscosidade e que a dissolução diretamente em água fervente foi a metodologia mais apropriada para a obtenção de caldos com maior viscosidade.

De acordo com Ordóñez *et al.* (2005) os grânulos de amido não são solúveis em água fria, porém eles têm capacidade de absorver certa quantidade de água, o que provoca um pequeno inchamento da matriz. Já quando a temperatura é aumentada, a força de vibração das moléculas de amido rompe as ligações intermoleculares, estabelecendo pontes de hidrogênio com a água e provocando o inchamento da matriz e diminuição do número e tamanho das regiões cristalinas.

Com a aderência dos grânulos de amido, aumenta a viscosidade, e a solução pode adquirir a forma de pasta. Com um tratamento térmico prolongado, ocorre uma pressão entre os grânulos, que podem se romper sob agitação, com redução da viscosidade.

O uso da alta temperatura (98°C) pode ter provocado a gelatinização do amido, considerando que, o conteúdo de amido nos grãos de feijão se encontra na faixa de 35 a 60% em peso seco (REDDY *et al.*, 1984), o que auxiliou no aumento da viscosidade do caldo. Dentre as mudanças que ocorrem num sistema de aquecimento de amido-água estão o poder de inchamento do grânulo, o aumento da viscosidade, translucência e solubilidade. Estas características definem o fenômeno de gelatinização do amido (SHIMELIS; MEAZA; RAKSHIT, 2006). Segundo Biliaderis (1992) a gelatinização do amido depende da temperatura e quantidade de água disponível para a transição de fase, sendo que, quanto mais rápida for a hidratação mais rápida ocorre a gelatinização.

Os amidos extraídos das variedades de feijão branco estudadas por Shimelis, Meaza e Rakshit (2006) apresentaram temperaturas de gelatinização entre 84,4 a 86,4°C. Nos estudos de Wosiacki *et al.* (1990) a hidratação e gelatinização de amidos isolados de duas cultivares de mandioca em água a 80°C não atingiu valores tão altos quanto os encontrados para o uso de água em ebulição.

No entanto, a gelatinização do amido, bem como, a viscosidade das soluções e as características dos géis formados dependem não apenas da temperatura, mas também dos outros componentes da solução. Em muitos casos o amido é ligado a açúcares, proteínas, gorduras e ácidos; estes podem dificultar o inchamento dos grânulos, impedindo a sua união com as moléculas da água (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Também foram avaliados os aspectos dos caldos após os tratamentos térmicos e observou-se uma coloração uniforme e o aparecimento de grumos em todos os caldos. De acordo com Maia e Golgher (1983) produtos em pó que apresentam baixa capacidade de penetração da água (por capilaridade) tendem a formar grumos durante a adição e mistura com a água. A formação de grumos indicou que o uso da secagem em estufas pode ter sido inadequado por conferir baixa capacidade de absorção da água aos pós de feijão. Contudo, a escolha do método mais adequado para esse tipo de produto leva em consideração a

agregação de valor final e por isso outros métodos tecnologicamente mais econômicos poderiam ser testados.

4.10 ANÁLISES QUÍMICAS

A fim de avaliar a influência do processo fermentativo e da secagem sobre a composição nutricional do feijão, realizaram-se análises químicas do feijão cru (FC), caldo de feijão não fermentado (controle) (CNF), caldo de feijão fermentado (CF) e caldo de feijão fermentado e desidratado (CFD) (TABELA 23 e 24).

TABELA 23 – TEOR DE UMIDADE E SÓLIDOS TOTAIS DAS AMOSTRAS DE FEIJÃO

Composição (g/100 g)	FC	CNF	CF	CFD
Umidade**	14,04 ^b ± 0,34	83,33 ^a ± 1,02	84,71 ^a ± 1,23	2,00 ^c ± 0,21
Sólidos totais**	85,96 ^b ± 0,34	16,67 ^c ± 1,02	15,29 ^c ± 1,23	98,00 ^a ± 0,21

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: **Resultados com letras diferentes na mesma linha apresentam diferenças significativas ao nível de 1%. FC = feijão cru, CNF = caldo de feijão não fermentado, CF = caldo de feijão fermentado, CFD = caldo de feijão fermentado e desidratado

TABELA 24 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS AMOSTRAS DE FEIJÃO (BASE SECA)

Composição (g/100 g)	FC	CNF	CF	CFD
Proteínas*	20,93 ^b ± 0,55	22,76 ^{ab} ± 0,73	23,85 ^a ± 0,18	23,03 ^a ± 0,40
Lipídios	1,82 ^a ± 0,29	2,23 ^a ± 0,28	2,54 ^a ± 0,25	1,68 ^a ± 0,23
Cinzas**	4,57 ^b ± 0,51	11,27 ^a ± 1,04	12,15 ^a ± 1,62	10,16 ^a ± 0,30
Fibra bruta	5,32 ^a ± 0,16	5,12 ^a ± 0,21	4,62 ^a ± 0,31	5,01 ^a ± 0,23
Carboidratos totais**	67,36 ^a ± 0,62	58,62 ^b ± 1,70	56,84 ^b ± 1,38	60,12 ^b ± 0,56
^a Estaquiase**	3,68 ^a ± 1,80	5,20 ^a ± 1,57	0,00 ± 0,00	0,025 ^b ± 0,03
^a Rafinose*	1,17 ^b ± 1,61	3,44 ^a ± 0,71	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: *Resultados com letras diferentes na mesma linha apresentam diferenças significativas ao nível de 5%. **Resultados com letras diferentes na mesma linha apresentam diferenças significativas

ao nível de 1%.^aOligossacarídeos da Família Rafinose estão incluídos na fração dos carboidratos totais. FC = feijão cru, CNF = caldo de feijão não fermentado, CF = caldo de feijão fermentado, CFD = caldo de feijão fermentado e desidratado

4.10.1 Umidade

O feijão cru (variedade preto) apresentou um teor de umidade (14,04%) próximo ao encontrado por Mesquita *et al.* (2007) para algumas linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com valores que variaram de 13,76 a 18,26% de umidade.

4.10.2 Proteína

O teor protéico do grão de feijão cru (20,93%) foi superior ao encontrado por Oliveira *et al.* (2001) (18,4%). Mechi, Caniatti-Brazaca e Arthur (2005) analisaram o teor protéico de feijão preto *Phaseolus vulgaris* L. variedade Diamante Negro e encontraram valores superiores (26,6%) ao deste trabalho. Nas variedades de feijão estudadas por Mejía *et al.* (2003) os valores obtidos também foram superiores (de 21,8 a 26,2%). O teor de proteína bruta de 29 genótipos de feijão do grupo comercial Carioca cultivados no ano 2001 e 2002 variou de 17% a 23,8% (LEMOS *et al.*, 2004). Os genótipos de feijão do grupo comercial preto estudados por Ribeiro *et al.* (2005) também apresentaram valores médios de proteína bruta (24,3%), superiores ao deste trabalho. De acordo com Geil e Anderson (1994) o feijão é constituído por 20 a 25% de proteínas. O valor protéico do feijão cru entre os lotes de feijão pode variar em função do local de cultivo, fatores ambientais e características da própria cultivar (LAJOLO; GENOVESE; MENEZES, 1996).

De acordo com Costa *et al.* (2006) os processamentos térmicos, como o cozimento, podem provocar alterações físico-químicas nas proteínas, amidos e outros componentes de leguminosas, alterando o seu valor nutricional. Lombardi-Boccia *et al.* (1998) observaram uma redução de 1,3% Nesse estudo, porém, não foram constatadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre o feijão cru e o caldo de feijão sem fermentar, evidenciando que o tratamento térmico empregado foi eficiente na preservação desse componente.

As diferenças constatadas na quantificação das proteínas estiveram relacionadas ao processo de fermentação. O maior teor de proteínas após a fermentação poderia estar associado à síntese de enzimas durante o processo

metabólico ou à biomassa bacteriana, que poderia constituir uma fonte de nitrogênio. Após a fermentação e secagem as amostras apresentaram em torno de 23% de proteína, o que é considerado por Antunes *et al.* (1995), como alto valor protéico para o feijão.

4.10.3 Lipídios totais

O conteúdo de lipídios do feijão cru (1,82%) foi próximo ao relatado por alguns autores. Segundo Geil e Anderson (1994) conteúdo lipídico do feijão se encontra entre 1 a 3%. As cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) estudadas por Ramírez-Cárdenas, Leonel e Costa (2008) apresentaram teores de lipídios que variaram de 1,27 a 1,94%. Valores bem inferiores foram encontrados por Mechi, Caniatti-Brazaca e Arthur (2005) onde o feijão analisado apresentou 0,44% de lipídios. Nas 21 linhagens de feijão estudadas por Mesquita *et al.* (2007) a porcentagem de extrato etéreo variou de 0,53 a 2,55%.

Ramírez-Cárdenas, Leonel e Costa (2008) verificaram um aumento no conteúdo de lipídios de grãos de feijão de 13% (OB), 28% (DN), 42% (BRS) e 61% (PER) em relação ao feijão cru, após o cozimento com água de maceração em panela de pressão por 40 minutos. Esse fato não foi verificado nesse estudo, o que pode ser justificado pelo método de cozimento empregado.

4.10.4 Cinzas

O teor de cinzas (4,57%) encontrado para o feijão cru foi próximo ao relatado por Mechi, Caniatti-Brazaca e Arthur (2005) (4,9%). Em Mesquita *et al.* (2007) o conteúdo de cinzas de 21 linhagens de feijão variaram entre 3,0 a 4,9%. Segundo o mesmo autor, essas diferenças podem ser inerentes à linhagem ou condições de cultivo, como clima e fertilidade do solo.

A discrepância nos valores encontrados para o feijão cru e as outras amostras pode ser justificada pelo conteúdo de carbonato de cálcio adicionado ao caldo não fermentado, que permaneceu na etapa de fermentação e secagem ($p > 0,01$), contribuindo para maiores teores de cinzas. A adição do carbonato de cálcio representou um incremento de aproximadamente 5%. Desconsiderando-se este valor, o teor de cinzas das amostras com carbonato estaria próximo ao do feijão cru.

O método utilizado para o cozimento do feijão é um dos fatores que poderiam estar associados a um aumento no teor de cinzas. Estudos de Costa *et al.* (2006) relataram o aumento de 5% no teor de cinzas de feijões (cultivar IAC-carioca) cozidos com a água de maceração. Contraditariamente, das 5 cultivares de feijão analisadas Ramírez-Cárdenas, Leonel e Costa (2008) 4 apresentaram aproximadamente o mesmo conteúdo de cinzas para feijão cru e cozido com água de maceração.

4.10.5 Fibra bruta

A análise da fibra bruta não revelou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as amostras, indicando a preservação desse componente. O teor de fibra bruta encontrado no feijão cru (5,32%) esteve próximo ao encontrado por Ribeiro *et al.* (2005), que avaliou o teor de fibra bruta de 83 genótipos de feijão do grupo comercial preto e encontrou variações de 3,40 a 5,17%.

4.10.6 Carboidratos totais

O grão de feijão cru apresentou 67,36% de carboidratos totais. Ramírez-Cárdenas, Leonel e Costa (2008) analisando o conteúdo de carboidratos de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) encontraram valores próximos ao deste estudo, com teores que variam de 69,54% a 72,28%. O teor de carboidratos de feijão preto, variedade Diamante Negro, analisado por Mechi, Caniatti-Brazaca e Arthur (2005) correspondeu a 68,05%.

Uma redução no teor de carboidratos totais foi observada após o tratamento térmico (cozimento e esterilização). Isso poderia estar relacionado a reações químicas ocorridas na presença do calor.

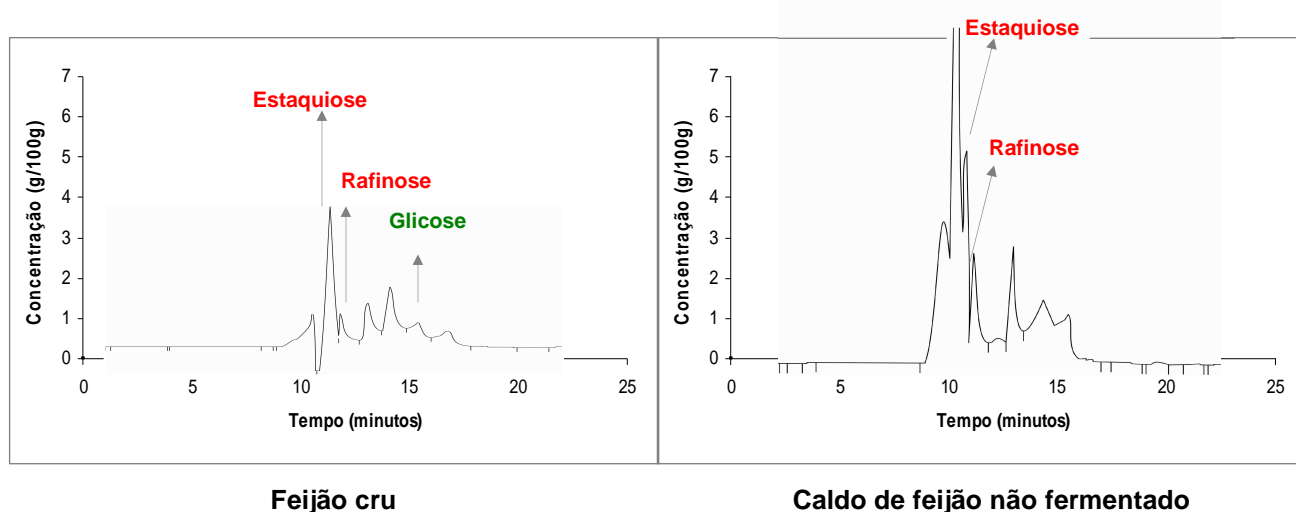
O conteúdo de carboidratos totais manteve-se constante após a fermentação, apesar do consumo de monossacarídeos (glicose e frutose+galactose) e oligossacarídeos (estaquiose e rafinose) pelo *L. agilis* LPB 56. Esse fato é relevante, desde que grande parte de outros açúcares não determinados, podem ter permanecido no produto, preservando a qualidade do feijão.

4.10.6.1 Estaquiose e rafinose

A concentração de estaquiose no feijão cru de 3,17% (base úmida) foi próxima a encontrada por Oliveira *et al.* (2001) (3,23% base úmida). No entanto, a composição do feijão pode mudar com a variedade e condições de cultivo. Muzquiz *et al.* (1999) avaliaram a influência do meio ambiente e da variedade de feijões cultivados em duas áreas da Espanha e notaram marcadas diferenças na concentração de α -galactosídeos totais.

A análise do caldo estéril (FIGURA 40) (controle) mostrou que a estaquiose não foi afetada pelo tratamento térmico ($p > 0,01$), permanecendo no caldo de fermentação. Para a rafinose, no entanto, foi observado um aumento de 194% em relação ao feijão cru, o que poderia ser justificado pela hidrólise de oligossacarídeos maiores, como a verbascose, resultando no incremento do teor de rafinose. Esses dados diferem dos encontrados por Mulimani, Thippeswamy e Ramalingam (1997) onde o cozimento ocasionou uma redução de 52,3% no conteúdo da rafinose e de 20,7% da estaquiose de grãos de soja; o que pode ter ocorrido em função do descarte da água de cozimento, prática não adotada neste trabalho.

Nenhuma concentração dos oligossacarídeos estaquiose e rafinose foi encontrada no caldo de feijão fermentado. Porém, uma quantidade residual de estaquiose (0,025%) foi detectada após a secagem do caldo, indicando um consumo total de 99,3% da estaquiose presente no feijão preto.



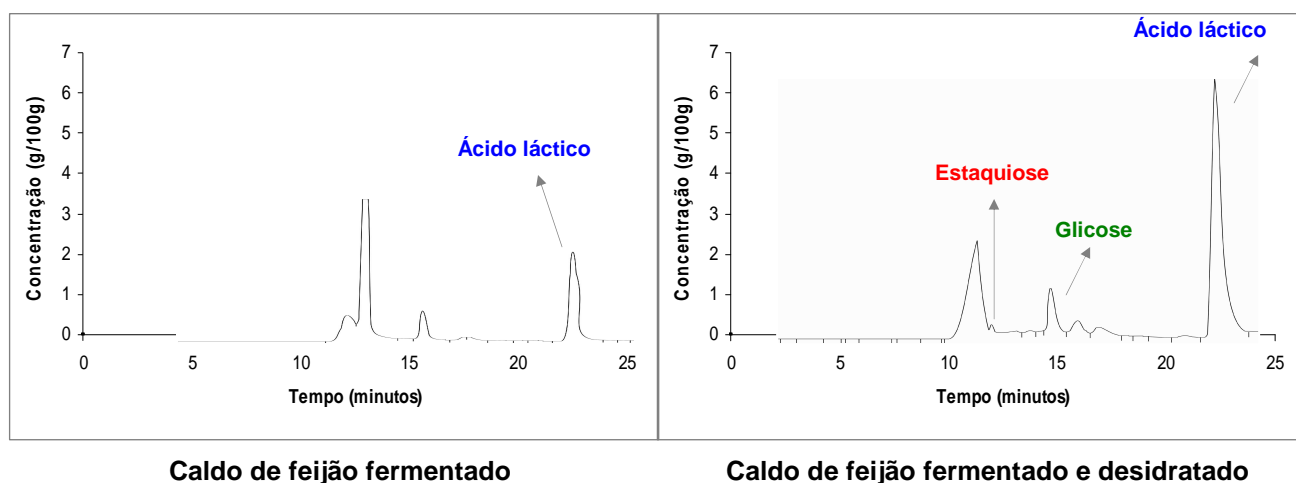


FIGURA 40 – CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE FEIJÃO

FONTE: O AUTOR (2008)

Diversos tipos de cromatógrafos vêm sendo usados na determinação dos oligossacarídeos da Família da Rafinose. Dentre alguns tipos de colunas relatadas na literatura estão a CarboPac PA-1, μ -Bondapak/Carbohydrate e aminopropil (NH_2) (GARCIA *et al.*, 2006; GRANITO *et al.*, 2002; GUIMARÃES *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2005). No presente trabalho, os oligossacarídeos foram quantificados usando a coluna Aminex HPX 87H, disponível no laboratório. No entanto, a dosagem dessas amostras, utilizando colunas de maior precisão, poderia aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos.

4.11 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

O produto de feijão fermentado e desidratado foi submetido a um controle microbiológico. Os padrões estabelecidos foram os mesmos para o grupo de hortaliças, legumes e similares, incluindo cogumelos (fungos comestíveis) – secos, desidratados ou liofilizados, incluindo cogumelos – segundo a resolução RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001).

TABELA 25 – ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DO FEIJÃO FERMENTADO E DESIDRATADO

Análises Microbiológicas	Coliformes a 45°C/g	Estafilococos coagulase positiva/g	<i>Salmonella</i> sp /25 g
<i>Padrão microbiológico RDC nº 12/2001</i>	10^3	10^2	<i>Ausência em 25 g</i>
Feijão não fermentado desidratado (controle)	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Ausência em 25 g
Feijão fermentado desidratado	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Ausência em 25 g

FONTE: O AUTOR (2008)

De acordo com a TABELA 25, pôde-se observar que todos os resultados atenderam aos padrões estabelecidos pela ANVISA, demonstrando que o processo de secagem foi efetivo tanto na segurança microbiológica do feijão fermentado como do não fermentado (controle). O processo fermentativo, portanto, não influenciou a qualidade microbiológica do produto final. Os resultados das análises confirmaram a estabilidade do produto seco após 1 mês de secagem.

4.12 ANÁLISE SENSORIAL

O feijão fermentado e desidratado foi reconstituído em água (15 g/100 mL) fervente ($\pm 98^\circ\text{C}$) por 5-10 minutos. O caldo obtido foi avaliado por 40 provadores a fim de se determinar o grau de aceitabilidade. A avaliação sensorial foi feita com o auxílio de um questionário (APÊNDICE 2), que forneceu informações sobre a aceitação do caldo reconstituído sem tempero, condimentado com sal e condimentado com tempero a base de legumes.

Através da avaliação sensorial foi possível determinar o grau de aceitação das amostras, que correspondeu a 7,5% para o caldo não condimentado, 60% para o caldo condimentado com sal e 77,5% para o caldo condimentado com tempero a base de legumes (TABELA 26). A análise de variância e o teste de Tukey mostraram que as três amostras diferiram significativamente ao nível de 1% (TABELA 27).

TABELA 26 – PERFIL DE ACEITABILIDADE DO PRODUTO REHIDRATADO

Escala hedônica	Número de provadores		
	Não condimentada (controle)	Condimentada com sal	Condimentada com tempero (legumes)
(9) Gostei extremamente			6
(8) Gostei muito		5	14
(7) Gostei moderadamente	3	19	11
(6) Gostei ligeiramente	4	9	5
(5) Indiferente	6	2	1
(4) Desgostei ligeiramente	15	2	3
(3) Desgostei moderadamente	7	2	
(2) Desgostei muito	4	1	
(1) Desgostei extremamente	1		
<i>Total de provadores</i>	<i>40</i>	<i>40</i>	<i>40</i>
Média	4,1^c	6,3^b	7,3^a

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: Resultados com letras diferentes apresentaram diferenças significativas ao nível de 1%

TABELA 27 – RESULTADOS DO TESTE DE ACEITABILIDADE

Fator	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Valor F
Tratamentos	2	206,150	103,075	52,286*
Resíduos	117	230,650	1,971	
Total	119	436,800		

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: *Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Dentre as características que agradaram os provadores estavam a coloração e a manutenção do sabor da matéria-prima (feijão), mostrando que o processo fermentativo não afetou fortemente a palatabilidade do feijão.

A textura arenosa da amostra mostrou que o processo de secagem foi deficiente. O uso do carbonato de cálcio deve ser melhor avaliado, já que sua presença pode ter ocasionado o aparecimento de um sabor amargo residual.

Segundo Gularte (2002) o limite mínimo para definir a aceitabilidade de produtos alimentícios é 7,0. O feijão condimentado com tempero a base de legumes apresentou média 7,3, sendo considerado aceitável. Apesar das médias dos outros caldos terem sido inferiores a 7,0, elas ainda demonstraram uma maior tendência a aceitabilidade do que a não aceitabilidade do produto. Aprimoramentos na formulação e avanços tecnológicos na etapa de secagem poderiam melhorar as características do produto de feijão, aumentando, dessa forma, sua aceitabilidade perante o consumidor.

4.13 ANÁLISE DE CUSTOS DO PROCESSO

A elaboração do feijão desidratado com teores reduzidos em oligossacarídeos da Família Rafinose (estaquiose e rafinose) envolveu custos de escala laboratorial. No QUADRO 4 é mostrada uma estimativa dos custos despendidos durante este trabalho.

QUADRO 4 – ESTIMATIVA DOS CUSTOS ENVOLVIDOS NA PESQUISA

Item	Quantidade	Valor (R\$)
Carbonato de cálcio	0,42 kg	29,40
Feijão preto (Alimentos Zaeli Ltda)	5 kg	20,00
TOTAL	R\$ 49,40	
Custo por litro de caldo	R\$ 1,65	
Kg de pó por litro de caldo	0,2	
Custo por kg de pó	R\$ 8,23	
Custos da secagem		
Valor da estufa FANEM® (L. 515)	R\$ 2.257,00	
Vida útil	10 anos	
Número de secagens por ano	360	

Continua

Custo por secagem	R\$ 0,63
Kg material seco por litro de caldo	0,2
Volume de caldo por secagem	4 litros
Depreciação da estufa para secar 1 kg de produto	R\$ 0,78
Tempo de secagem (h)	20
Potência da estufa (kW)	1
Consumo (kW.h)	20
Custo de 1 kW.h	R\$ 0,1873
Custo de 1 secagem	R\$ 3,746
Custo energético para secar 1 kg de produto	R\$ 4,6825
Custo energético + depreciação para secar 1 kg de produto	R\$ 5,47
Custo por kg de produto seco + custo de secagem	R\$ 13,70 + custo fixo
Custo fixo	
Meio MRS	R\$ 56,00
Análises químicas	R\$ 93,63
Análises microbiológicas	R\$ 23,52
Material de consumo (luvas, frascos, plásticos, pipetas)	R\$ 250,00
Total	R\$ 423,15*

FONTE: O AUTOR (2008)

*NOTA: Despesas envolvendo o consumo de água, energia elétrica e manutenção de equipamentos não foram consideradas.

O volume considerado para a estimativa dos custos foi de 30 litros de caldo fermentado. O custo foi dividido em custo fixo (meio MRS para o crescimento dos pré-inóculos e contagens de células viáveis, reagentes e meios de cultivo para

análises químicas e microbiológicas, e materiais de consumo como erlenmeyers, luvas, provetas, pipetas), custo variável (feijão e carbonato de cálcio) e custo de secagem. Despesas envolvendo o consumo de água e energia elétrica e a depreciação e manutenção de equipamentos não foram estimadas. A temperatura considerada para a secagem do caldo fermentado de feijão foi de 80°C durante 20 horas. Considerando que o teor inicial de umidade do caldo fermentado estava em torno de 85% e que, a umidade do produto seco deveria ser inferior a 4%, a perda de umidade durante a secagem seria de aproximadamente 80% (o que justifica o valor 0,2 no QUADRO 3). Logo, o custo foi estimado com base no custo da depreciação da estufa por kg de produto (R\$ 0,78) mais o custo da secagem de 1 kg do produto seco (R\$ 4,68), totalizando R\$ 5,47. Esse custo total de secagem somado ao custo variável (R\$ 8,23) para a produção de 1 kg de produto seco correspondeu a um custo total de R\$ 13,70 por kg de produto seco. O custo fixo (não dependente do volume produzido) foi equivalente a R\$ 423,15.

5 CONCLUSÕES

A bactéria *Lactobacillus agilis* LPB 56 selecionada demonstrou uma ótima capacidade de metabolizar os oligossacarídeos estaquiose (99,3%) e rafinose (100%) em 18 horas de fermentação. As variáveis que influenciaram o consumo desses açúcares no caldo de feijão foram a temperatura de incubação (37°C) e o uso do CaCO_3 (1,0%).

Neste estudo, a α -galactosidase pôde ser correlacionada com a redução dos oligossacarídeos da Família Rafinose, apresentando atividade máxima de 0,162 U/mL às 6 horas de fermentação no biorreator.

Os diferentes métodos e temperaturas de secagem empregadas tiveram a mesma influência sobre as características do produto seco. O uso da estufa a vácuo não demonstrou viabilidade econômica. A inclusão da etapa de centrifugação antes da secagem foi relevante para a diminuição do tempo de desidratação.

Verificou-se que a rehidratação do pó de feijão em água fervente foi o método que resultou nos maiores valores de viscosidade.

As análises químicas mostraram que poucas alterações ocorreram na composição química do feijão cru. O cozimento e esterilização do caldo, podem ter provocado a hidrólise de oligossacarídeos maiores, o que resultou no aumento do conteúdo de rafinose.

As análises microbiológicas classificaram o produto fermentado seco como seguro, atendendo a todos os padrões estabelecidos pela ANVISA. A etapa de secagem auxiliou na garantia da estabilidade do pó.

A avaliação sensorial do feijão reidratado demonstrou uma maior aceitação quando o produto foi condimentado com tempero a base de legumes. A opinião dos provadores também revelou a necessidade de melhoria na etapa de secagem, visando a obtenção de uma textura mais agradável do produto.

O produto desenvolvido mostra-se interessante para a indústria, porque simplifica as etapas de processamento, não necessitando de tratamentos prévios e reduzindo, dessa forma, os custos durante o processo. Além de servir como alternativa aos consumidores de feijão que sofrem com os sintomas causados pela flatulência, proporciona uma fonte de cálcio adicional, especialmente a grupos deficientes desse mineral.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **PN 13**: 014.01-015: análise sensorial. São Paulo, 1994.
- ABU-GHANNAM, N. Modelling textural changes during the hydration process of red beans. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 38, p. 341-352, 1998.
- ACEVEDO, E.; VELASQUE-CORONADO, L.; BRESSANI, R. Change in dietary fiber content and its composition as affected by processing of black beans (*Phaseolus vulgaris*, Tamazulapa variety). **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 46, n. 2, p. 139-145, 1994.
- AIDAR, H. P. Embrapa Arroz e Feijão. Sistemas de Produção, 2. Cultivo do feijoeiro comum: características da cultura, 2003. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)**. Disponível em: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm> >. Acesso em: 19/8/2008.
- ALANI, S. R.; SMITH, D. M.; MARKAKIS, P. α -galactosidases of *Vigna unguiculata*. **Phytochemistry**, New York, v. 28, n. 8, p. 2047-2051, 1989.
- ANDERSON, R.A. *et al.* Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. **Cereal Science Today**, n. 14, p. 4-7, 11-12, 1969.
- ANTUNES, P. L. *et al.* Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares rico 23, carioca, pirata-1 e rosinha-G2. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 12-18, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 17 ed. Gaithersburg, Maryland, USA, 2000.
- ARAGÃO, J. L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Feijão transgênico: um produto da engenharia genética. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, p. 48-51, 1998. Disponível em: < <http://www.biotecnologia.com.br> >. Acesso em: 20/8/2008.
- AW, T. L.; SWANSON, B. G. Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality. **Journal of Food Science**, v. 1, n. 50, p. 67-71, 1985.

AZEVEDO, L. *et al.* Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, n. 41, p. 1671-1676, 2003.

BAELE, M.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK, F. *Lactobacillus agilis* is an important component of the pigeon crop flora. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 488-491, 2001.

BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. S.; YONG, K. P. Purification and characterization of a -galactosidase from bean *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Food Science**, v. 6, n. 50, p. 1766-1767, 1985.

BARAMPAMA, Z; SIMARD, R. E. Oligosaccharides, antinutritional factors and protein digestibility of dry beans as affected by processing. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 4, p. 833-838, 1994.

BARAMPAMA, Z; SIMARD, R. E. Effects of soaking, cooking and fermentation on composition, in-vitro starch digestibility and nutritive value of common beans. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 4, n. 48, p. 349-365, 1995.

BARROS, B.; SCARMINO, S. I.; BRUNS, E. R. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Unicamp, 1995.

BASHA, S. M. Soluble sugar composition of peanut seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 780-783, 1992.

BIELECKA, M. *et al.* Effect of non-digestible oligosaccharide on gut microecosystem in rats. **Food Research International**, n. 35, p. 139-144, 2002.

BILIADERIS, C.G. Structures and phase transitions of starches in food systems. **Food Technology**, v. 45, n. 6, p. 98-109, 1992.

BOREJSZO, Z.; KHAN, K. Reduction of flatulence-causing sugars by high temperature extrusion of pinto bean high starch fractions. **Journal of Food Science**, v. 57, 771-777, 1992.

BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia industrial**: engenharia bioquímica. 1 ed. São Paulo : Edgard Blücher Ltda, 2001.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, Alexandria, v. 2, p. 455-475, 1960.

BRASIL. Resolução n. 386, de 05 de agosto de 1999. Regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=11541&word=>>. Acesso em: 3/10/2008.

BRASIL). Resolução n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=br> >. Acesso em: 25/9/2008.

BRESSANI, R. ; ELÍAS, L. G. ; ESPAÑA, M. Possibles relaciones entre medidas físicas, químicas y nutricionales en frijol comum (*Phaseolus vulgaris*). **Archives Latinoamerican of Nutrition**, Venezuela, v. 31, n. 3, p. 551-570, 1981.

BUCKENHÜSKES, H. J. Fermented vegetables. In: DOYLE, P. D.; BEUCHAT, L. R., MONTVILLE, T. J. (Eds.). **Food Microbiology**: fundamentals and frontiers. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 1997. p. 595–609.

BULPIN, P. V.; GIDLEY, M. J.; JEFcoat, R. Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant α -galactosidase. **Carbohydrates Polymers**, v. 12, p. 155-168, 1990.

CALLOWAY, D. H. Gas in the alimentary canal. In: CODE, C. **Handbook of Physiology**. Washington DC: American Physiological Society, 1968. pp. 2839-2859.

CALLOWAY, D. H.; HICKEY, C. A.; MURPHY, E. L. Reduction of intestinal gas forming properties of legumes by traditional and experimental food processing methods. **Journal of Food Science**, v. 36, p. 251–255, 1971.

CARLSSON, N.-G.; KARLSSON, H.; SANDBERG, A.-S. Determination of oligosaccharides in foods, diets and intestinal contents by high-temperature gas chromatography and gas chromatography/ mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2404-2412, 1992.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO FEIJÃO (CIF). Histórico. Disponível em: < <http://www.cifeijao.com.br/index.php?p=historico> >. Acesso em: 20/1/2008.

CHIARADIA, A. C. N.; GOMES, J. C. **Feijão**: química, nutrição e tecnologia. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Feijão, 2005. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/pr/feijao/feijaomar2005.doc> >. Acesso em: 10/9/2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Distrito Federal, set/2008. Estudos de prospecção de mercado. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/conabweb/download/cas/especiais/prospeccao_2008_09.pdf >. Acesso em: 10/9/2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Feijão total (1^a, 2^a e 3^a safra): quadro comparativo de área, produção e produtividade, safras 2006/2007 e 2007/2008, 8^o levantamento, maio/2008. **Centro de Inteligência do Feijão (CIF)**. Disponível em: <http://www.cifeijao.com.br/downloads/p__8_levantamento_de_safra_-_conab_-_maio_120508.pdf >. Acesso em: 10/10/2008.

COSTA, G. E. A. *et al.* Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chemistry**, United Kingdom, v. 94, n. 3, p. 327-330, 2006.

CRISTOFARO, E.; MATTU, F.; WUHRMANN, J. J. Involvement of the raffinose family of oligosaccharide in flatulence. In: SIPPLE, H. L.; MCNATT, K. W. (Eds.), **Sugars in Nutrition**. New York: Academic Press, 1974.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, p. 353-361, 1996.

CUMMINGS, J. H. Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. **The Lancet**, v. 206, p. 1206-1209, 1983.

CUMMINGS, J. H.; ENGLYST, H. N.; WIGGINS, H. S. The role of carbohydrates in lower gut function. In: The nutritional reemergence of starchy foods. **Naeringsforsk**, 30 (Suppl.), p. 17-21, 1986.

CUMMINGS, J. H., *et al.* Review. A new look at dietary carbohydrate: physiology and health. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 417-423, 1997.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. A review: the control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 443-459, 1991.

DELLAGLIO, F. *et al.* Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: DE ROISSART, H.; LUQUET, F. M. **Bactéries Lactiques**: aspects fondamentaux et technologiques. n. 1. France: Lorica, 1994. p. 25-116.

DE LUMEN, O. B. Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legumes: a review. **Food Structure**, v. 11, p. 33-46, 1992.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DE REZENDE, S. T.; FELIX, C. R. Production and characterization of raffinose-hydrolysing and invertase activities of *Aspergillus fumigatus*. **Folia Microbiologica**, v. 44, p. 191-195, 1999.

DEY, P. M. D-Galactose containing oligosaccharides. In: _____. **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. London, UK: Academic Press, 1985. pp. 5-129.

DEY, P.M. Oligosaccharides. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Eds.). **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, 1990. pp. 189-218.

DEY, P.M.; PRIDHAM, J. B. Biochemistry of α -galactosidases. **Advanced Enzymology**, v. 36, p. 91-130, 1972.

DONKOR, O. N. *et al.* α -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. **Food Chemistry**, v. 104, p.10-20, 2007.

DOPICO, B.; NICOLÁS, G.; LABRADOR, E. Partial purification of cell wall α -galactosidases and α -arabinosidases from *Cicer arietinum* epicotyls: relationship with cell wall autolytic processes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 75, p. 465-468, 1989.

DUTCOSKY, S. D. Métodos sensoriais. In: DUTCOSKY, S. A. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Champagnat, 1996. pp. 79-85.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Embrapa arroz e feijão. Sistemas de cultivo. Cultivares de feijão. **Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP)**. Disponível em: < www.cnpaf.embrapa.br/feijao/index.htm >. Acesso em: 12/9/2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Embrapa arroz e feijão. Origem e história do feijão. Disponível em: < <http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/historia.htm> >. Acesso em: 16/10/2008.

EVANGELISTA, J. **Conservação de alimentos**. In: _____. TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 392-424.

FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de los alimentos**: principios y prácticas. Zaragoza, España: Acribia S. A., 1994.

FERREIRA, C. L. L. P. **Produtos lácteos fermentados**: aspectos bioquímicos e tecnológicos. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1987.

FERREIRA, C. M. Mercado de feijão. Agência de informação EMBRAPA. Feijão. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)**. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/AG01_69_1162003151646.html >. Acesso em: 16/10/2008.

FERREIRA, C. M.; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C. **Feijão na economia nacional**. Santo Antônio de Goiás, 2002. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP). CNPAP, documentos n. 135. 47 p.

FLEMING, S. E. A. Study of relationships between flatus potential and carbohydrate distribution in legume seeds. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 794–803, 1981.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION - FAO. FAOSTAT database. Major food and agricultural commodities and producers. Countries by commodity, 2005. Disponível em: < <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=en&item=176&year=2005> >. Acesso em: 3/10/2008

FUJIMOTO, Z. *et al.* Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 22, p. 20313-20318, 2003.

GARCIA, I. S. *et al.* Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* lam. (Brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2B, p. 739-745, 2006.

GDALA, J. *et al.* The influence of α -galactosidase supplementation on the ileal digestibility of lupin seed carbohydrates and dietary protein in young pigs. **Animal Feed Science Technology**, v. 67, p. 115-125, 1997.

GEIL, P. B.; ANDERSON, J. W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, Clearwater, v. 13, n. 6, p. 549-558, 1994.

GIBSON, G. R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 412-420, 1994.

GIRAUD, E. **Contribution a l'etude physiologique et ezimologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolee du mandioc fermente**. 139 f. Thèse – Université de Provence, Aix-Marseille, France, 1992.

GOYCOOLEA, F. *et al.* Efecto de los tratamientos caseros en la preparación de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el contenido de taninos y valor nutritivo de lãs proteínas. **Archives of Latinoamerican Nutrition**, Venezuela, v. XL, n. 2, p. 263-274, 1990.

GRANITO, M. *et al.* Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 3, p. 226-231, 2002.

GUIMARÃES, V. M. *et al.* Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolyses of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, p. 67-73, 2001.

GULARTE, M. A. **Manual de Análise Sensorial de Alimentos**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2002.

HAMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B.;

HOLZAPFEL, W. H. (Eds.) **The genera of lactic acid bacteria**. v. 2. London: Chapman & Hall, 1995. pp. 19-28.

HARDINGE, M. G.; SWARNER, J. B.; CROOKS, H. Carbohydrates in foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 46, p. 197-204, 1965.

HARRIGAN, W. F.; MCCANCE, M. E. **Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology**, 2nd ed. London: Academic Press, 1976.

HOBEN; H. J.; SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1246-1247, 1982.

HOLZAPFEL, W. H. *et al.* Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 85–101, 1998.

HOLZAPFEL, W. H. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365S–373S, 2001.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, p. 109-116, 2002.

HOU, J-W.; YU, R-C.; CHOU, C-C. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research International**, v. 33, p. 393-397, 2000.

HUGHES, J.S. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. **Food Technology**, v. 45, n. 9, p.122-126, 1991.

IBÉRIA. Feijão: variedades. Disponível em: < <http://www.iberiacorretora.com.br/htm/feijao/tipos.php> >. Acesso em: 14/7/2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Cereais, Leguminosas e Oleaginosas de 2007. **Pesquisa Agrícola Municipal (PAMCLO)**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pamclo/2007/pamclo2007.pdf> >. Acesso em: 3/10/2008.

ISOLAURI, E. *et al.* Probiotics: effects on immunity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 444S–450S, 2001.

IYER, V. *et al.* Quickcooking beans (*Phaseolus vulgaris*, L.): II. Phytates, oligosacharides and antienzymes. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 45-52, 1980.

JAY, J. M. Conservação de alimentos por secagem. In: _____. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. pp. 387-399.

JAY, J. M. Fermentação e Produtos Lácteos Fermentados. In: _____. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. pp. 131-149.

JOHANSSON, M. L. *et al.* Administration of different Lactobacillus strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 15-20, 1993.

JOOD, S.; CHAUHAN, B.M.; KAPOOR, A.C. Protein digestibility (*in vitro*) of chickpea and blackgram seeds as affected by domestic processing and cooking. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 39, n. 2, p. 149-154, 1989.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 49, p. 209-224, 1983.

KARP, S. G. **Production of L-lactic acid from the soybean vinasse**. 47 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

KATARIA, A.; CHAUHAN, B. M.; PUNIA, D. Digestibility of proteins and starch *in vitro* of amphidiploids (black gram x mung bean) as affected by domestic processing and cooking. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 42, n. 2, p.117-125, 1992.

LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M.I., MENEZES, E. W. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A., STONE, L. F.: ZIMMERMANN, M. J. O. (Coords). **Qualidade nutricional**: cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: Potafos, 1996. pp. 23-56, 71-99.

LeBLANC, J. G.; GARRO, M. S.; SAVOY DE GIORI, G. Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, alpha-galactosidase activity and fermentation products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p.119–123, 2004.

LeBLANC, J. G. *et al.* *Lactobacillus fermentum* CRL 722 is able to deliver active α -galactosidase activity in the small intestine of rats. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, p. 177-182, 2005.

LEMOS *et al.* Características agronômicas e tecnológicas de genótipos de feijão do grupo commercial Carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 4, p. 319-326, 2004.

LEVITT, M. D. *et al.* H₂ excretion after ingestion of complex carbohydrates. **Gastroenterology**, v. 92, p. 383–389, 1987.

LIYING, Z. *et al.* Effects of stachyose on performance, diarrhoea incidence and intestinal bacteria in weanling pigs. **Archives of Animal Nutrition**, v. 57, p. 1-10, 2003.

LOMBARDI-BOCCIA, G. *et al.* The inhibitory effect of albumin extracts from white beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) on in vitro iron and zinc dialysability: role of phytic acid. **Food Chemistry**, United Kingdom, v. 63, n. 1, p. 1-7, 1998.

MACFARLANE, G. T.; GIBSON, G. R. Metabolic activities of the normal colonic flora. In: GIBSON, S. A. W. (Ed.). **Human health: the contribution of microorganisms**. London: Springer, 1994. pp. 17-52.

MACHAIAH, J. P.; PEDNEKAR, M. D. Carbohydrate composition of low dose radiation-processed legumes and reduction in flatulence factors. **Food Chemistry**, v. 79, p. 293–301, 2002.

MADHUJITH, T.; SHADIDI, F. Antioxidant potential of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v. 70, p.85–89, 2005.

MAIA, A. B. R.; GOLGHER, M. Parâmetros para avaliação da qualidade de reconstituição do leite em pó desidratado em secador de aspersão ("spray-drier"). **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 235-254, 1983.

MANSOUR, E. H.; KHALIL, A. H. Nutritional changes during the fermentation of chick pea (*Cicer arietinum*) flour. **Menofiya Journal of Agricultural Research**, v. 20, p. 151-164, 1995.

MANZANARES, P.; GRAAFF, L. H.; VISSER, J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel α -galactosidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, p. 383-390, 1998.

MARTINS, C. R. F. *et al.* **Técnica de coloração de Gram**. Brasília, 1997. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, manual, série TELELAB. 63 p.

MASSAGUER, P. R. de. Bactérias lácticas e cocos. In: _____. **Microbiologia dos Processos Alimentares**. São Paulo: Varela, 2005. pp. 57-67.

MECHI, R.; CANIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. Avaliação química, nutricional e fatores antinutricionais do feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 1, n. 25, p. 109-114, 2005.

MEJÍA, E.G. *et al.* Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, and lectins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of Mexico. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 20, p. 5962-5966, 2003.

MESQUITA, F. R. *et al.* Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1114-1121, 2007.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 439-450, 1999.

MITAL, B. K.; STEINKRAUS, K. H.; NAYLOR, H. B. Growth of lactic acid bacteria in soymilks. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 1018-1022, 1974.

MONTEIRO, A. C. O. *et al.* Isolation and partial characterization of a lectin from *Canavalia dictyota* seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 3, p. 167-172, 1998.

MOSSEL, D. A. A.; INGRAM, M. The physiology of the microbial spoilage of foods. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 18, p. 232-268, 1955.

MULIMANI, V. H.; THIPPESWAMY, S.; RAMALINGAM. Enzymatic degradation of oligosaccharides in soybean flours. **Food Chemistry**, v. 59. n. 2, p. 279-282, 1997.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 587-597, 2007.

MUZQUIZ, M. *et al.* The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus Vulgaris*: environmental and varietal differences. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 4, n. 3, p. 210–216, 1999.

NACZK, M *et al.* Condensed tannins in canola hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 10, n. 42, p. 2196-2200, 1994.

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P.K.; SRIVASTAVA, A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 167-178, 2004.

OBOH, H. A. Anti-nutritional constituents of six underutilized legumes grown in Nigéria. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 307–312, 1998.

OETTERER, M.; SARMENTO, S. B. S. Propriedades dos açúcares. In: OETTERER, M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2006. pp. 135-153.

OLIVEIRA, A. C. de *et al.* O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose. **Archivos Latino-americanos de Nutrición**, v. 51, n. 3, p. 276-283, 2001.

OLIVEIRA G. de *et al.* Purificação e caracterização de α -galactosidases de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 4, p. 535-543, 2005.

ONYENEKWE, P. C.; NJOKU, G. C.; AMEH, D. A. Effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) processing methods on flatus causing oligosaccharides. **Nutrition Research**, v. 20, n. 3, p. 349-358, 2000.

ORDÓÑEZ, J. A. *et al.* Carboidratos. In: _____. **Tecnologia de alimentos: componentes de alimentos e processos**. v. 1. Porto Alegre: Artmed, 2005. pp. 74-75.

ORDÓÑEZ, J. A. *et al.* Conservação de alimentos com base na modificação do pH, da atmosfera e da atividade de água. Evaporação e desidratação. In: _____. **Tecnologia de alimentos**: componentes de alimentos e processos. v. 1. Porto Alegre: Artmed, 2005. pp. 219-242.

PATWARDHAN, V. N.; WHITE, J. R. Problems associated with particular foods. In: COMMITTEE ON FOOD PROTECTION; FOOD AND NUTRITION BOARD; NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Toxicants occurring naturally in foods**. 2nd ed. Washington D. C.: National Academy of Sciences, 1973. pp. 484-489.

PETTERSON, D. S.; MAKINTOSH, J. B. The Chemical Composition and Nutritive Value of Australian Grain Legumes, **Grains Research and Development Corporation**, Brisbane, Australia, p. 10–13, 38-41, 1994.

PEYRIN-BIROULET, L.; BIGARD, M.-A. Gas digestifs (digestive gas). **EMC-Hépatogastroentérologie**, v. 2, p. 370-387, 2005.

PLAYNE, M. J.; CRITTENDEN, R. Commercially available Oligosaccharides. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 313, p. 10-22, 1996.

PORTER, J. E. *et al.* Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean α -galactosidase. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v. 14, p. 609-613, 1992.

POTTER, N. N. **La ciencia de los alimentos**. 1ed. México, Buenos Aires: Centro Regional de Ayudd Tecnica, 1973.

PRICE, K. R. *et al.* Flatulence: causes, relation to diet and remedies. **Die Nahrung**, v. 32, p. 609–626, 1988.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de bebida probiótica à base de água de coco**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 200-213, 2008.

REDDY, N. R. *et al.* Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates: a review. **Food Chemistry**, v. 13, p. 25-68, 1984.

REID, G. *et al.* Potential uses of probiotics in clinical practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 658-672, 2003.

REIS, J. N. P. Desempenho comercial da agricultura brasileira: os casos do feijão e do milho. **Informações econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 20-28, 2006.

RESENDE, O. *et al.* Avaliação da qualidade tecnológica do feijão durante o armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 517-524, 2008.

REYES-MORENO, C.; PAREDEZ-LÓPEZ, O. Hard-to-cook phenomenon in common beans: a review. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 3, p. 227-286, 1993.

RIBEIRO, N. D. *et al.* Dissimilaridade genética para o teor de proteína e fibra em grãos de feijão dos grupos preto e de cor. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 167-173, 2005.

ROSSAIRT, H. De ; LUQUET, F. M. **Bactéries lactiques**: aspects fondamentaux et technologique. ed. 1. v. 2. France: Loriga, 1994.

ROY, D.; CHEVALIER, P.; SAVOIE, L. Sugars fermented by *Bifidobacterium infantis* ATCC27920 in relation to growth and a-galactosidase activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 653–655, 1991.

SAKLA, A. B. *et al.* The effect of environmental conditions on the chemical composition of soybean seeds: relationship between the protein, oil, carbohydrate and trypsin inhibitor content. **Food Chemistry**, v. 29, p. 221-231, 1988.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 69-80, 1999.

SALMINEN, S. *et al.* Lactic acid bacteria in health and disease. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Eds.). **Lactic acid bacteria**: microbiology and functional aspects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1998. pp. 211–253.

SALUNKHE, D. K. Legumes in human nutrition: current status and future research needs. **Current Science**, v. 51, p. 387-392, 1982.

SÁNCHEZ-MATA, M. *et al.* Determination of mono-, di-, and oligosaccharides in legumes by high-performance liquid chromatography using an amino-bonded silica column. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 46, p. 3648-3652, 1998.

SANNI, I.; ONILUDE, A. A.; OGUNDOYE, O. R. Effect of bacterial galactosidase treatment on the nutritional status of soybean seeds and its milk derivative. **Nahrung: chemie, biochemie, mikrobiologie, technologie, Ernaehrung**, Berlim, v. 41, p. 18-21, 1997.

SARHADDAR, S. *et al.* **Lactic acid extraction and purification process**. United States Patent 5641406, Jun. 24, 1997.

SAT, I. G.; KELES, F. The effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of seker a dry bean variety (*P. vulgaris*, L) grown in Turkey. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 206-208, 2002.

SCALABRINI, P. *et al.* Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 213–219, 1998.

SCHIFFRIN, E. J. *et al.* Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 491–497, 1995.

SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The lactic acid bacteria: the genera of lactic acid bacteria**. v. 2. London: Blackie Academic and Professional, 1995. pp. 7-11.

SCHWEIZER, T. F.; HORMAN, I.; WÜRSCH, P. Low molecular weight carbohydrates from leguminous seeds; a new disaccharide: galactopinitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, n. 2, p. 148 – 154, 1978.

SEIJAS, C. A. *et al.* Feijão: Embrapa lança mais uma opção para cultivo de feijão preto no país, 2004. Disponível em: < www.zoonews.com.br/noticias2/noticia.php?idnoticia=41880 >. Acesso em: 6/12/2007.

SGARBIERI, V. C. Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Review of Nutrition and Dietetics**. Basel, Karger, Suíça, v. 60, p. 132-198, 1989.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996.

SHAHIDI, F. Beneficial health effects and drawbacks of antinutrients. In: _____. **Antinutrients and phytochemicals in food**. Washington: American Society, 1997. pp. 1-9.

SHIBUYA, H. *et al.* Purification and some properties of alpha-galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 2333-2335, 1995.

SHIMELIS, E. A.; MEAZA, M.; RAKSHIT, S. K. Physico-chemical properties pasting behavior and functional characteristics of flours and starches from improved bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. **Agricultural Engineering International**: the CIGR Ejournal, manuscript FP 05 015, v. VIII, Fev., 2006.

SHIROTA, M.; ASO, K.; IWABUCHI, A. Study on microflora of human intestine. I. The alteration of the constitution of intestinal flora by oral administration of *L. acidophilus* strain Shirota to healthy infants. **Japanese Journal of Microbiology**, v. 21, p. 274-283, 1966.

SILVA, H. C.; BRAGA, G. L. Effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of dry beans (*P. vulgaris*). **Journal of Food Science**, v. 47, p. 924-925, 1982.

SILVA, H. C. *et al.* Oligossacarídeos da família da rafinose e flatulência. **Cadernos de Nutrição**, São Paulo, v. 4, p. 48-60, 1992.

SILVA, O. F. Sócioeconomia: dados conjunturais – Brasil, principais estados produtores, consumo per capita de arroz e feijão. Embrapa Arroz e Feijão, 2007. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**. Disponível em: < http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/docs/arroz/consumo_percapita.htm >. Acesso em : 19/8/2008.

SILVA, S. C. da; STEINMETZ, S. Cultivo do feijoeiro comum: clima. Embrapa Arroz e Feijão, Sistemas de produção, 2003. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)**. Disponível em: <[http://sistemasde producao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/Cultivodo Feijoeiro/clima.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/Cultivodo_Feijoeiro/clima.htm)>. Acesso em: 19/8/2008.

SIMPSON, W. J.; TAGUCHI, H. The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Eds.) **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman and Hall, 1995. pp. 125-172.

SOMIARI, R. I., BALOGH, E. Effect of soaking, cooking and crude alpha-galactosidase treatment on the oligosaccharide content of cowpea flours. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 61, p. 339-343, 1993.

SOUZA, M. R. *et al.* Influence of intensive and extensive breeding on lactic acid bacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* ceca. **Veterinary Microbiology**, v. 120, p. 142-150, 2007.

STAMER, J. R. Lactic acid bacteria. In: _____. **Food microbiology**: public health and spoilage aspects. Westport, CT: AVI, 1976. pp. 404-426.

STATSOFT. Statistica: data analysis software system, vs. 6.0, Amsterdam, 2001. 1 CD-ROM.

SUAREZ, F. *et al.* Insights into human colonic physiology obtained from the study of flatus composition. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 1028–1033, 1997.

SUAREZ, F. L.; SPRINGFIELD, J.; LEVITT, M. D. Identification of gases responsible for the odour of human flatus and evaluation of a device purported to reduce this odour. **Gut**, v. 43, p. 100–104, 1998.

SURESH, B.; RITU, T.; RAVISHANKAR; G. A. Biotransformations as applicable to food industries. In: SHETTY, K. *et al.* **Food Biotechnology**. 2nd ed. USA, Canada: CRC Press, 2006. pp. 1666-1670.

TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. **Cereal Chemistry**, v. 67, p. 551-557, 1990.

THIPPESWAMY, S.; MULIMANI, V. H. Enzymatic degradation of Raffinose family oligo-saccharides in soyamilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 635–640, 2002.

TOMLIN, J.; LOWIS, C.; READ, N. W. Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. **Gut**, v. 32, p. 665–669, 1991.

TOMOMATSU, H. Health Effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v. 10, p. 61-65, 1994.

TORRE, M; RODRIGUEZ, A. R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 1991.

TSANGALIS, D.; SHAH, N. P. Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acids in soymilk by probiotic bifidobacteria. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 541-554, 2004.

TSUDA, T. *et al.* Antioxidative pigments isolated from the seeds of the *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p. 248-251, 1994.

VAN BARNEVELD, R. J. Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, p. 203-230, 1999.

VELDMAN, A. *et al.* Effect of α -galactosides and α -galactosidase in feed on ileal piglet digestive physiology. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 69, p. 57-65, 1992.

VIANA, S. de F. *et al.* Hydrolyses of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 93, p. 665-670, 2005.

VIDAL-VALVERDE, C.; FRIAS, J.; VALVERDE, S. Changes in the carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 93, n. 5, p. 547-550, 1993.

VILLEN, R. A. **Biotecnologia**: histórico e tendências. São Caetano do Sul-SP. Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, Escola de Engenharia Mauá. Disponível em : < <http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm> >. Acesso em: 19/8/2006.

VISSOTTO, F. Z. *et al.* Avaliação da influência dos processos de lecitinação e aglomeração nas propriedades físicas de achocolatado em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 666-671, 2006.

WANDER, A. E.; RAMALHO, M. A. P.; ANDRADE, M. J. B. de. Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na região Sul de Minas Gerais: mercado e comercialização, 2005. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)**. Disponível em: < http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes_HTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafrasulMG/mercado_comercializacao.htm >. Acesso em: 6/6/2008.

WANDER, A. E.; RAMALHO, M. A. P.; ANDRADE, M. J. B. de. Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na região Sul de Minas Gerais: introdução e importância econômica, 2005. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes_HTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafrasulMG/index.htm >. Acesso em: 6/6/2008.

WANG, Y-C. *et al.* Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 20, p. 333–338, 2003.

WEE, Y.J.; KIM, J.N.; RYU, H.W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 163-172, 2006.

WEISS, N. *et al.* *Lactobacillus sharpeae* sp. nov. and *Lactobacillus agilis* sp. nov., two new species of homofermentative, meso-diaminopimelic acid-containing lactobacilli isolated from sewage. **Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene**, v. 2, p. 242-253, 1981.

WESSELS, S. *et al.* The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 498-505, 2004.

WIKIPEDIA. Gastrointestinal tract. Disponível em: < http://en.wikipedia.org/wiki/Gastrointestinal_tract >. Acesso em: 7/5/2008.

WOSIACKI, G.; *et al.* A mandioca (*Manihot esculenta*, C.) cultivar IAPAR-19 Pioneira 2- Características da fração amido. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 33, n. 2, p. 255-264, 1990.

XIAOLI, X. *et al.* Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 111, p. 215-219, 2008.

YOKOYAMA, L. P. Cultivo do feijoeiro comum: importância e econômica. Embrapa Arroz e Feijão. Sistemas de Produção, 2003. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)**. Disponível em: < http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/Cultivado_Feijoeiro/importancia.htm >. Acesso em: 19/8/2008.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

VARIEDADES DE FEIJÃO CULTIVADAS NO BRASIL



Feijão preto



Feijão azuki arroz



Feijão carioca



Feijão rajado



Feijão rajado pequeno



Feijão mulatinho



Feijão rosinha



Feijão roxinho



Feijão *cranberry*



Feijão alubia



Feijão bico-de-ouro



Feijão canário

Fonte: <http://www.ibericacorretora.com.br/htm/feijao/tipos.php> (2008)

APÊNDICE

APÊNDICE 1

VARIEDADES DE FEIJÃO CULTIVADAS NO BRASIL



Feijão bolinha vermelho



Feijão vermelho



Feijão rajado vermelho



Feijão vinagrinho



Feijão cavalo



Feijão jalo



Feijão fabada



Feijão branco pequeno



Feijão fradinho



Feijão caupi pequeno



Feijão caupi branco



Feijão macaçar

Fonte: <http://www.ibericacorretora.com.br/htm/feijao/tipos.php> (2008)

APÊNDICE 2

Nome: _____ Data: _____ Horário: _____

Por favor, analise as amostras, utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou dos caldos de feijão. Marque a opção que mais expressa a sua opinião.

Amostra _____

- ☐ Gostei extremamente
- ☐ Gostei muito
- ☐ Gostei moderadamente
- ☐ Gostei ligeiramente
- ☐ Indiferente
- ☐ Desgostei ligeiramente
- ☐ Desgostei moderadamente
- ☐ Desgostei muito
- ☐ Desgostei extremamente

Amostra _____

- ☐ Gostei extremamente
- ☐ Gostei muito
- ☐ Gostei moderadamente
- ☐ Gostei ligeiramente
- ☐ Indiferente
- ☐ Desgostei ligeiramente
- ☐ Desgostei moderadamente
- ☐ Desgostei muito
- ☐ Desgostei extremamente

Amostra _____

- ☐ Gostei extremamente
- ☐ Gostei muito
- ☐ Gostei moderadamente
- ☐ Gostei ligeiramente
- ☐ Indiferente
- ☐ Desgostei ligeiramente
- ☐ Desgostei moderadamente
- ☐ Desgostei muito
- ☐ Desgostei extremamente

Comentários: _____

Na sua opinião, o produto testado poderia ser usado como base para outros produtos alimentícios? ☐ sim ☐ não